



**T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



YÜKSEK LİSANS TEZİ

**KO-KÜLTÜR SİSTEMİYLE ANTİMİKROBİYAL PEPTİD ELDESİ
ÜZERİNE ÇALIŞMALAR**

Ayşegül YANIK

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Moleküler Biyoloji ve Genetik Programı

**DANIŞMAN
Dr. Öğr. Üyesi Çağatay TARHAN**

Ocak, 2022

İSTANBUL

Bu alışma, 26.01.2022 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, Moleküler Biyoloji Programında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Jürisi

Dr. Öğr. Üyesi Çağatay TARHAN(Danışman)
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi

Dr. Öğr. Üyesi Murat PEKMEZ
Üniversite
Fen Fakültesi

Prof. Dr. Cenk KIĞ
Yeni Yüzyıl Üniversitesi
Tıp Fakültesi

İntihal Programı Beyanı

20.04.2016 tarihli Resmi Gazete’de yayımlanan Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin 9/2 ve 22/2 maddeleri gereğince; Bu Lisansüstü teze, İstanbul Üniversitesi’nin aboneli olduğu intihal yazılım programı kullanılarak Fen Bilimleri Enstitüsü’nün belirlemiş olduğu ölçütlere uygun rapor alınmıştır.

Proje Destekleri

Bu tez, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yürütücü Sekreterliğinin 33660 numaralı projesi ile desteklenmiştir.

Tezden Üretilmiş Yayınların Künye Bilgileri

--

ÖNSÖZ

Lisans ve Yüksek Lisans eğitimim boyunca, bilgi ve birikimlerini benimle paylaşan, akademik süreçlerde yol gösteren, desteğini, sabrını ve hoşgörüsünü öğrencilerinden esirgemeyen çok değerli danışman hocam Dr. Öğr. Üyesi Çağatay TARHAN'a teşekkürlerimi sunarım.

Başta Prof. Dr. Bedia PALABIYIK ve Dr. Öğr. Üyesi Semian KARAER UZUNER olmak üzere, üzerimde büyük emekleri olan Araş. Gör. Merve YILMAZER ve Araş. Gör. Burcu KARTAL'a, çalışmalarım boyunca yanımda olan çok değerli arkadaşlarım Ceren SAYLAN ve Hande ULUDAĞ'a ve geriye kalan tüm Maya Genetiği ve Biyoteknolojisi Araştırma Laboratuvarı mensuplarına tüm kalbimle teşekkür ederim.

Aynı şekilde sabırla ve hoşgörüsüyle bilgi birikimini benimle paylaşan, her daim sorularıma yanıtsız kalmayan, Sayın Dr. Öğr. Üyesi Murat PEKMEZ'e, yardımlarını benden hiçbir zaman esirgemeyen Yunus AKSÜT ve Aslıhan ŞENGELLEN'e teşekkürlerimi sunarım.

En içten ve samimi duygularıyla tüm süreç boyunca, her türlü desteğiyle yanımda olan sevgili arkadaşım Büşra KÖSE'ye teşekkür ederim.

Tez çalışmam boyunca, her zaman gösterdiği manevi desteği ve inancı ile yanımda olan çok değerli meslektaşım ve hayat arkadaşım Bekir Ahmet İLGAR'a tüm kalbimle teşekkür ederim.

Son olarak, her zaman sevgilerini ve desteklerini esirgemeyen, aldığım kararlarda beni her daim destekleyen, bana sevmeyi ve seilmeyi öğreten canım aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Ocak 2022

Ayşegül YANIK

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖNSÖZ	iv
İÇİNDEKİLER.....	v
ŞEKİL LİSTESİ	vii
TABLO LİSTESİ.....	viii
SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ	ix
ÖZET	xiii
SUMMARY	xv
1. GİRİŞ	1
2. GENEL KISIMLAR.....	3
2.1. MİKROBİYAL REKABET.....	3
2.1.1. Rekabet Stratejileri	4
2.2. KO-KÜLTÜR SİSTEMLERİ	6
2.3. <i>Shizosaccharomyces pombe</i>	11
2.4. <i>Escherichia coli DH5A</i>	13
3. MALZEME VE YÖNTEM.....	15
3.1. ORGANİZMA VE BESİYERİ.....	15
3.1.1. Organizmaların Üretilmesi ve Saklanması	16
3.1.2. Ko-kültürün Kurulması	17
3.2. PROTEİN ANALİZLERİ	17
3.2.1. Protein Eldesi.....	17
3.2.2. Protein Konsantrasyonunun Saptanması	18
3.2.3. SDS-PAGE	19
3.2.4. Coomassie Blue Boyama.....	22
3.2.5. LC/MS-MS	22
3.2.6. Proteinlerin Sınıflandırılması ve Fonksiyonlarının Araştırılması	23
4. BULGULAR.....	24
4.1. PROTEİN ANALİZ SONUÇLARI	24
4.1.1. Protein Konsantrasyonları	24
4.1.2. Elektroforetik Analiz Sonuçları	25
4.1.3. LC-MS/MS Sonuçları.....	27

5. TARTIşMA VE SONUÇ	44
KAYNAKLAR.....	49
ÖZGEÇMİş	59



ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa No

Şekil 2.1: Paklitaksel öncüleri üretmek için ko-kültür tasarımı Zhou ve diğerlerinden (2015) alınmıştır.....	9
Şekil 4.1: BSA standartları ile çizilen standart grafiği ($R^2= 0.9987$).....	24
Şekil 4.2: Coommasie boyama sonrasında görünür hale gelen protein bantları.....	26
Şekil 4.3: Tanımlanan proteinlerin hücresel yerleşimine göre sınıflandırılması.....	43
Şekil 4.4: Tanımlanan proteinlerin hücresel işlevine göre sınıflandırılması.....	43

TABLO LİSTESİ

	Sayfa No
Tablo 3.1: Çalışmada kullanılan <i>S.pombe</i> ve <i>E. coli</i> ırklarının özellikleri.....	15
Tablo 3.2: Çalışmada kullanılan besiyeri ve içerikleri	16
Tablo 3.3: SDS-PAGE Solüsyonları	20
Tablo 3.4: Ayırma ve yükleme jeli içerik ve miktarları (1 jel için gerekli miktarlar verilmiştir.).....	21
Tablo 4.1: Her bir örnek için hesaplanan protein konsantrasyonları.....	25
Tablo 4.2: LC-MS/MS Sonuçları	27
Tablo 4.2 (devam): LC-MS/MS Sonuçları	28

SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ

Simgeler	Açıklama
%	: Yüzde
Cr	: Krom
Cu	: Bakır
Fe	: Demir
g	: Gram
h/mL	: Mililitredeki hücre sayısı
Kbç	: Kilo Baz Çifti
kDa	: Kilo Dalton
M	: Molar
Mbç	: Mega Baz Çifti
Mg	: Miligram
ml	: Mililitre
mm	: Milimetre
mM	: Milimolar
Mn	: Mangan
nm	: Nanometre
°C	: Derece Santigrat
pH	: Hidrojenin gücü (“Power of Hydrogen”)
S	: Svedberg katsayısı
S	: Kükürt
V	: Volt
w/v	: Ağırlık/hacim
β	: Beta
Δ	: Delesyon
μg	: Mikrogram
μl	: Mikrolitre
μm	: Mikrometre

Kısaltmalar	Açıklama
ABC	: ATP- Bağlayıcı Kaset (“ATP-binding cassette”)
AcOH	: Asetik Asit
ACP	: Açıl taşıyıcı protein
ADP	: Adenosin difosfat
Ahr	: Aldehit Redüktaz
APS	: Amonyum persülfat
ASA	: L-Aspartat semialdehit
ATP	: Adenozin 3'-trifosfat
BCA	: Bişinkonik Asit
BPG	: 1,3-bifosfogliserat
BSA	: Sığır Serum Albumini (“Bovine Serum Albumin”)
CDI	: Temas bağımlı büyüme inhibasyonu
Clp	: Kazeonolitik Proteaz
CoA	: Koenzim-A
CP	: Karbamoil Fosfat
cPHB	: (R)- 3- Hidroksibütirat
DacA	: D-alanil D-alanin karboksipeptidaz A
DacC	: D-alanil D-alanin karboksipeptidaz C
DadA	: D-amino asit dehidrogenaz
dH₂O	: Distile su
DhaL	: Dihodriksiaseton kinaz alt birimi L
DNA	: Deoksiribo Nükleik Asit
Dps	: Açlık proteini sırasında DNA koruması proteini
<i>E. coli</i>	: <i>Escherichia coli</i>
EPS	: Ekstraselüler Polisakkarit
EtOH	: Etanol
FBP	: Fruktoz-1,6-bifosfat
FocC	: Fimbria Biyogenezi Öncü Proteini C
FocD	: Fimbria Biyogenezi Öncü Proteini D
FtsZ	: Sıcaklık duyarlı filamentleştirici mutant Z (“Filamenting temperature-sensitive mutant Z”)
G1	: Büyüme 1 (“Growth 1”)
G2	: Büyüme 2 (“Growth 2”)

G3P	: Gliseraldehit 3-Fosfat
GABA	: Gama aminobütirik asit
GalF	: Galaktofrunoz
GalP	: Galaktoprinoz
GDP	: Guanizin Difosfat
gldA	: Gliserol Dehidrogenaz A
GroEL	: <i>Escherichia coli</i> Cpn60
GroES	: <i>Escherichia coli</i> Cpn10
GTP	: Guanin trifosfat
HCl	: Hidroklorik asit
HflK	: Yüksek Frekanslı Lizojenizasyon K (“ High Frequency Lysogenization k”)
HTH	: Helix-turn-helix
KDPG	: 2-Keto-3-Deoksi-6-Fosfoglukonat
KHG	: 2-keto-4-hidroksiglulatarat
lamB	: Malto porin B
LB	: Luria-Bertani sıvı besiyeri
LC-MS	: Sıvı Kromatografi- Kütle Spektrometrisi
LC-MS/MS	: Sıvı Kromatografi- Kütle Spektrometrisi/ Kütle Spektrometrisi
L-GAP	: L-gliseraldehit 3-fosfat
malE	: Maltoz/maltodekstrin bağlayıcı periplazmik proteini E
malK	: Maltoz/maltodekstrin bağlayıcı periplazmik proteini K
malM	: Maltoz/maltodekstrin bağlayıcı periplazmik proteini M
ME-2,4cPP	: 2-metil-D-eritrol 2,4-siklodifosfat
MeOH	: Metanol
mgIB	: D-galaktoz bağlayıcı periplazmik proteini B
mRNA	: Mesajcı RNA
MS	: Kütle Spektrometrisi
NAD	: Nikotinamid adenin dinükleotid
NADH	: Nikotinamid adenin dinükleotit hidrojen
NADPH	: Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat
OD	: Optik yoğunluk
OmpA	: Dış membran proteini A (“Outer membrane Protein A”)
OmpC	: Dış membran proteini C (“Outer membrane Protein C”)
OmpD	: Dış membran proteini D (“Outer membrane Protein D”)

OmpF	: Dış membran proteini F (“Outer membrane Protein F”)
OmpX	: Dış membran proteini X (“Outer membrane Protein X”)
ORN	: Ornitin
PAGE	: Poliakrilamid jel elektroforezi
PEP	: Fosfoenol Pirüvat
PhoH	: Fosfat H
PotF	: Putresin bağlayıcı periplazmik protein
PPi	: Pirofosfat
PstS	: Fosfat bağlayıcı Protein S
PTS	: Fosfotransferaz Sistemi
QS	: Quorum Algılama (“Quorum Sensing ”)
RbsB	: Riboz çıkarma bağlayıcı Proteini B
RNAP	: RNA polimeraz
ROS	: Reaktif Oksijen Türü
Rpm	: Dakika/devir sayısı
RpoS	: RNA polimeraz sigma
rRNA	: Ribozomal ribonükleik asit
S	: Sentez
<i>S. pombe</i>	: <i>Schizosaccharomyces pombe</i>
SDS	: Sodyum dodesilsülfat
SodA	: Süperoksit dismutaz A
sRNA	: Küçük RNA
T6SS	: Tip 6 Salgılama Sistemi
TCA	: Trikloroasetik Asit
THF	: Tetrahidrofolat
tRNA	: Taşıyıcı RNA
Ts	: Sıcaklık Kararlı (“Thermo Stabil”)
UDP	: Uridin Difosfat
UDP-GlcNAc	: Uridin difosfat-N-asetilglukozamin
UDP-ManNAc	: Uridin difosfat-N-asetilmannomasin
UPEC	: Uropatojenik <i>E.coli</i>
UTP	: Uridin Trifosfat
YEA	: Maya ekstreli katı besiyeri (“Yeast Extract Agar”)
YEL	: Maya ekstreli sıvı besiyeri (“Yeast Extract Liquid”)

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

KO-KÜLTÜR SİSTEMİYLE ANTİMİKROBİYAL PEPTİD ELDESİ ÜZERİNE ÇALIŞMALAR

Ayşegül YANIK

İstanbul Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Danışman : Dr. Öğr. Üyesi Çağatay TARHAN

Doğal ekosistem şaşırtıcı derecede çeşitliliğe sahip mikrobiyal türler barındırır. Mikroorganizma popülasyonları besinler ve çevredeki diğer kaynaklara ulaşma bakımından bir ortak yaşam alanı içerisinde bulunur. Mikroorganizmaların ideal laboratuvar koşullarında üretilmesi, onların doğal ekosistem şartlarından uzaklaştırır ve onları kendi mikrobiyal dünyalarından, özellikle de rakiplerinden izole eder. Laboratuvarlarda kullanılan geleneksel saf kültürleme teknikleriyle küçük moleküllerin aracılık ettiği etkileşimler hesaba katılmaz, bu da etkileşimlerin kesin yapısının büyük ölçüde bilinmemesine neden olmaktadır.

Ko-kültür sistemleri iki ya da daha fazla sayıda farklı hücre popülasyonunun bir arada üretildiği sistemlerdir. Bu şekilde popülasyonlar arasındaki doğal etkileşimlere ilişkin çalışmalar yapılabilen ve doğada gözlenmeyen sentetik etkileşimler sağlanabilmektedir. Bu sistemlerle doğal ürün keşfi, mikrobiyal ekoloji, evrim ve patogeneze çalışmaları yapılmaktadır. Ayrıca endüstriyel, çevresel ve tıbbi çalışmalarda ko-kültür sistemlerinin kullanımı karşımıza çıkmaktadır.

Bu tez çalışmasında kendi laboratuvarlarımızda bulunan *Schizosaccharomyces pombe*'nin yabancı ırkıyla *Escherichia coli*'nin DH5α ırkı kendilerine özgü besi yerlerinde çoğaltıldıktan sonra farklı hücre sayısı kombinasyonlarıyla %0,1 glikoz içeren besiyerlerine ekilerek 48 saat ve 72 saat boyunca kültürlenmiş ve hücrelerin besiyerine saldıkları proteinlerdeki farklılaşma SDS poliakrilamid jellerde gözlemlenmiştir. Ko-kültür koşullarında kontrol koşullarından

farklı olarak ortaya çıkan yeni protein bantları saptanmış ve bu bantların iki tanesi kütle spektrometresi (MS) yöntemiyle analiz edilmiştir. MS sonucunda 110 tane protein elde edilmiştir. Bu proteinler; çeşitli karbonhidrat bağlayıcı proteinler, çeşitli sinyal moleküllerinin ve antibiyotiklerin tanımlanmasında görevli membran proteinleri ve çeşitli hücrel süreçlerde yer alan diğer proteinler olarak karşımıza çıkmıştır. Sonuç olarak elde edilen proteinlerin kalori kısıtlaması ve rakip popülasyonun varlığında artış gösterdiği görülmüştür.

Aralık 2021, 75 sayfa.

Anahtar kelimeler: Ko-kültür, Antimikrobiyal Peptid, *Shizosaccharomyces pombe*, *Escherichia coli*.



SUMMARY

M.Sc. THESIS

STUDIES ON ANTIMICROBIAL PEPTIDE OBTAINING BY CO-CULTURE SYSTEM

Aysegul YANIK

İstanbul University

Institute of Graduate Studies in Sciences

Department of Molecular Biology and Genetics

Supervisor : Assist. Prof. Dr. Cagatay TARHAN

The natural ecosystem contains an astonishing variety of microbial species. Populations of microorganisms exist in a common habitat in terms of access to nutrients and other resources in the environment. Cultivation of microorganisms in ideal laboratory conditions apart them from their natural ecosystem conditions and isolates them from their microbial world, especially from their competitors. With traditional pure culture-oriented cultivation techniques used in laboratories, interactions mediated by small molecules are not taken into account, resulting in the precise nature of the interactions being largely unknown.

Co-culture systems are systems in which two or more different cell populations are grown together. In this way, studies on natural interactions between populations can be made and synthetic interactions that are not observed in nature can be provided. With these systems, natural product discovery, microbial ecology, evolution and pathogenesis studies are carried out. In addition, the use of co-culture systems in industrial, environmental and medical studies is encountered.

In this thesis study, the wild strain of *Schizosaccharomyces pombe* and the DH5 α strain of *Escherichia coli* in our own laboratories were grown in their own specific media, cultured for 48 hours and 72 hours by planting in media containing 0,1% glucose with different cell number,

and the differentiation in the proteins released by the cells into the medium was observed in SDS polyacrylamide gels.

Different from the control conditions, new protein bands that emerged under the co-culture conditions were detected and two of these bands were analyzed by mass spectrometry (MS). As a result of MS, 110 proteins were obtained. These proteins are; Various carbohydrate-binding proteins, membrane proteins involved in the identification of various signaling molecules and antibiotics, and other proteins involved in various cellular processes. As a result, it was observed that the obtained proteins increased in the presence of calorie restriction and competitor population.

January 2022, 75 pages.

Keywords: Co-culture, Antimicrobial Peptide, *Shizosaccharomyces pombe*, *Escherichia coli*.



1. GİRİŞ

Doğal ortamda gerçekleşen mikrobiyal etkileşimler, organizmaların hayatta kalmaları için kritik öneme sahiptir. Bu doğal etkileşimlere ikincil metabolitler, sinyal algılama molekülleri ve peptitler gibi çeşitli moleküller aracılık eder (Fuqua ve diğ., 2001; Waters ve diğ., 2005). Laboratuvarlarda kullanılan geleneksel saf kültür üretme teknikleri mikroorganizmaları doğal ortamlarından izole ettiği için, küçük moleküllerin aracılık ettiği etkileşimleri hesaba katmaz, bu da etkileşimlerin kesin yapısının büyük ölçüde bilinmemesine neden olmaktadır (Park ve diğ., 2011).

Ko-kültür sistemleri hücreler arası etkileşimleri incelemek amacıyla iki ya da daha fazla sayıda farklı hücre popülasyonunun bir arada üretilmesine izin veren karışık kültürler içeren sistemlerdir. Bu sistemlerle deneyleri yürütmenin ana nedenleri; popülasyonlar arasındaki doğal etkileşimlerin incelenmesi, bazı popülasyonlar için kültür başarısının artırılması ve popülasyonlar arasında sentetik etkileşimlerin kurulması olarak sıralanabilir. Ko-kültür sistemleri, hücre popülasyonları arasındaki etkileşimleri incelemek için, doğal ürün keşfi için, biyoteknolojik çalışmalarla elde edilen ürün verimliliğini arttırmak ve kültür davranışlarını iyileştirmek için; temel bilimsel çalışmalarda, endüstriyel ve tıbbi çalışmalarda uzun zamandır kullanılmaktadır (Goers ve diğ., 2014). Ayrıca enfeksiyon mekanizmalarını keşfetme (Cottet ve diğ., 2002) yapay doku yapımına yönelik girişimler ve ilaç özellikli bileşik bulma ve geliştirme (Morae ve diğ., 2012; Kim, 2005) gibi çalışmalar ko-kültür sistemleriyle etkin biçimde yapılmaktadır. Gelecekteki endüstriyel, tıbbi veya çevresel ortak kültür uygulamaları göz önünde bulundurularak, birçok sentetik biyoloji sistemi geliştirilmiştir. Bunlardan bazıları patojenleri öldürmek için tasarlanan bakteriyel hücreler, bazı terapötik uygulamalar (Bermúdez-Humarán ve diğ., 2011) ve tümör hedefleme (Anderson ve diğ., 2008) olarak özetlenebilir.

Birlikte kültürleme tekniğini uygulayarak ve de modifiye ederek daha önce saptanmamış antimikrobiyal özellikli yeni peptidler izole edilebilir. Bu şekilde yeni ilaç etken maddeleri bulunup geliştirilebilir. Dahası ko-kültürleme tekniği ile organizmalar arasında daha önce saptanmamış etkileşimler saptanabilir ve de organizmanın kendisine özgü çalışılmamış yeni yollar keşfedilebilir.

Bu tez çalışmasında *Schizosaccharomyces pombe*'nin yabani ırkı ile *Escherichia coli DH5 α* 'nın ko-kültür şartlarında besiyerine saldıkları proteinlerdeki farklılaşma saptanmaya çalışılacaktır. Ko-kültürün kontrol koşullarından farklı olarak ortaya çıkan yeni protein bantlarının SDS poliakrilamid jel elektroforeziyle belirlenmesi, bu bantların hangi proteinlere ait olduğunu Kütle Spektrometrisi yöntemiyle saptanması hedeflenmektedir. Bu proteinler ko-kültürü oluşturulmuş mikroorganizmaların kendi metabolik aktiviteleri sonucunda hücre dışına salgıladıkları, açlık gibi stres koşulları altında salgıladıkları, birbirlerine karşı salgıladıkları herhangi bir protein olabilir. Besiyerinde tespit edilen proteinlerin antibakteriyal ya da antifungal olma ihtimali de bulunmaktadır. Bu çalışma *Schizosaccharomyces pombe* ve *Escherichia coli DH5 α* 'nın hücre dışına salgıladığı proteinlere ait verilerin yetersizliği sebebi ile yeni proteinlerin keşfini mümkün kılma potansiyelini taşımaktadır.

2. GENEL KISIMLAR

2.1.MİKROBİYAL REKABET

Doğal ekosistem şaşırtıcı derecede çeşitliliğe sahip mikrobiyal türler barındırır. Mikroorganizma popülasyonları besinler ve çevredeki diğer kaynaklara ulaşma bakımından tam anlamıyla bir ortak yaşam alanı içerisinde bulunur. Aşırılık sergileyen ortamlar (çok tuzlu, yüksek/düşük pH derecesinde vb.) dışında çoğu ortam yüksek sayıda mikroorganizma popülasyonu içerir. Günümüzde bu çeşitlilikler, metagenomik dizileme ve mikrobiyal etiket dizileme gibi moleküler teknikler kullanılarak ortaya çıkarılmaktadır (Sogin ve diğ., 2006, Rusch ve diğ., 2007). Bu çeşitlilik zenginliği, astrofizikten bir terminoloji ödünç alarak "mikrobiyal karanlık madde" olarak adlandırılmaktadır (Stewart, 2012; Lok, 2015).

Makro organizmalar gibi, mikroorganizmalar da atmosferdeki azotu topraktaki çeşitli formlara dönüştüren mikrobik kümeler veya ev sahiplerine yarar sağlayan simbiyotik organizmalar gibi bazı türlerin sıkı bir şekilde ilişkili olduğu ve hayatta kalmak için büyük ölçüde birbirlerine bağlı olduğu minyatür bir alanda yaşarlar (Ghoul ve Mitri, 2016). Bu mikrobiyal popülasyonlar sıklıkla birbirleriyle etkileşime girer. İki mikrobiyal popülasyon arasındaki olası etkileşimler, pozitif etkileşimler (komensalizm, protokooperasyon ve mutualizm), negatif etkileşimler (amensalizm ve rekabet) ve biri için olumlu, diğer popülasyon için olumsuz olan etkileşimler (parazitlik ve avlanma) olarak kabul edilebilir (Bailey ve Ollis, 1986; Atlas ve Bartha, 1998).

Mikroorganizmaların bulunduğu alanlardaki yoğunluğu ve çoğu ortamdaki kaynakların kıtlığı göz önüne alındığında, bir hücrenin hayatta kalması bir başka hücre için açlık anlamına gelebilir ve bu da güneş ışığı, besinler veya yaşam alanı gibi sınırlı kaynaklar için şiddetli rekabete yol açabilir. Bir suş, rakip bir suşta bir uyum azalmasına neden oluyorsa ve çevresel baskılardan ziyade rekabetin bir sonucu olarak evrimleşme olasılığı daha yüksek oluyorsa, bu suşun rekabetçi bir fenotip sergilediği düşünülmektedir (Ghoul ve Mitri, 2016). Mikrobiyal türler arasındaki ve tür içindeki bu rekabet, çevredeki mikrobiyal yaşamın önemli bir yönünü oluşturur (Hibbing ve diğ., 2010).

Besin kaynağı, güneş ışığı ve niş alanı yetersizliği gibi bazı durumlarda popülasyonlar, rakipleri için toksik veya engelleyici olan kimyasalları çevreye salgılar. İki popülasyon arasındaki rekabet, özellikle rekabet tek bir kaynağa odaklandığında ve popülasyonlar başka türlü

etkileşime girmediğinde, popülasyonlardan birini ortak yaşam alanlarından uzaklaştırma eğilimindedir (Fredrickson ve Stephanopoulos, 1981).

Özellikle besin kaynakları mikrobiyal rekabetin odak noktasıdır. Besin kaynağı miktarı ile mikroorganizma büyüme kinetiği arasında çoğunlukla doğrusal bir korelasyon bulunmaktadır. Bakteriyel büyüme kinetiği çalışmalarında öncü olan Jacques Monod, ilk olarak besin konsantrasyonlarının sınırlandırılması ile bakteri büyümesi arasındaki ilişkiyi göstermiş olup neredeyse tüm izole edilmiş besin maddelerinin fazla sağlandığı tanımlanmış ortamda bakteri büyüme veriminin, besin kısıtlaması uygulanmış ortamlardan daha iyi olduğunu göstermiştir (Monod, 1949).

Mikrobiyal büyüme ve metabolik işlevler için gerekli olan besinler karbon, hidrojen, fosfor, nitrojen, kükürt, kalsiyum, demir ve diğer metalleri içerir (Barber ve Elde, 2015; Bren ve diğ., 2013; Aldén ve diğ., 2001). Mikroorganizmaların biyokütleleri arttıkça, mikrobiyal gruplar genişler ve besinlerin daha bol olduğu alanlarda kolonileşmek üzere diğerleri ile rekabet eder. Bu durumlarda besin için rekabet kaçınılmazdır.

Besin ve yaşam alanı dışında üçüncü ve daha az yaygın olarak kabul edilen bir kaynak genetik materyaldir (Ghoul ve Mitri, 2016). DNA, konağın hayatta kalma ve uyum sağlama yeteneğini artırarak yararlı özellikler sağlayabilir. Bakteri topluluklarında görülen gen transferi özellikle antibiyotik direnç genlerinin edinilmesinde belirgin avantaj sağlar (Freese ve diğ., 2014). Aynı zamanda, mikroorganizmalar gen transferi yaparak rekabeti ortadan kaldıracırlar. Borgeaud ve diğerleri (2015) T6SS mekanizması ile *Vibrio cholerae*'nin komşu hücrelere toksik genler aktararak onları elimine ettiği göstermiştir.

2.1.1. Rekabet Stratejileri

Mikroorganizmalar kaynaklar için iki biçimde rekabet ederler: sömürücü rekabet olarak da adlandırılan pasif rekabet ve aktif rekabet. Pasif rekabet sırasında, bir tür diğerine dolaylı yoldan kaynak tüketimi yoluyla zarar verirken aktif rekabet durumunda, iki rakip suşun hücreleri, doğrudan ve aktif müdahale yoluyla (kimyasal madde salınımı vb.) birbirine zarar verir (Ghoul ve Mitri, 2016; Bauer ve diğ., 2018).

Pasif rekabette, bir türün sindirim enzimleri ya da sideroforları (demir kelatörleri, çözünmeyen demire erişim sağlamak için üretilirler) salgılanması yolu ile diğer türlerin besin maddelerine

erişimini kısıtlaması örnek verilebilir (Diggle ve diğ., 2007; Rendueles ve Ghigo, 2012, Griffin ve diğ., 2004; Scholz ve Greenberg, 2015).

Bununla birlikte bu moleküllerin üretimi maliyetlidir. Mikroorganizmalar daha az enerji sarf ederek besin kullanımını arttırmak için kendi metabolik düzenleme biçimlerini değiştirerek de pasif rekabet edebilirler (Ackermann, 2015). Hile yapmak olarak da tanımlanan bu pasif rekabet biçiminde organizmalar, diğer türlerin gen anlatım ürünlerini kullanarak, maliyetli genlerin anlatımının azatmak veya ortadan kaldırmak suretiyle kendilerine seçici avantaj sağlarlar (Diggle ve diğ., 2007, Griffin ve diğ., 2004). Gore ve diğerlerinin yaptıkları çalışmada (2009), besin kaynağı olarak sakkarozun bulunduğu bir ortamda, *Saccharomyces cerevisiae*'nin sakkarozu hidrolize eden bir enzim olan invertazı üretmeyen bir mutant suşunun, yabani tip *S. cerevisiae* hücre popülasyonundan faydalanabildiği ve onu istila edebildiği gösterilmiştir. Burada bir hücre tarafından oluşturulan Glukozun komşu hücrelerce kullanıldığını göz önüne aldıklarında, bir "hileci" suşun, invertaz salgılamayıp diğer hücrelerin oluşturduğu Glukozu tüketerek iş birliği içerisindeki hücrelerden faydalanmasının mümkün olabileceğini düşünmektedirler.

Son olarak, mikroorganizmalar sürfaktan gibi yüzey aktif maddeler, ramnolipidler, adezyon veya anti-adezyon moleküller (adezinler) veya hücre dışı polisakkaritler (EPS) gibi alan yapısını ve/veya mikrobiyal hareketliliğini etkileyen moleküllerin üretimi yoluyla belirli bir alana yayılarak/işgal ederek pasif rekabet edebilirler. Bu şekilde değişen beslenme biçimine ve fiziksel koşullara uyum sağlamak, diğer türlerin kaynaklara erişimini engellemek suretiyle kendilerini sürekli olarak yeniden konumlandırabilir ve niş içinde birincil konuma geçebilirler (An ve diğ., 2006, Kim ve diğ., 2014, Nadell ve Bassler, 2011, Schluter ve diğ., 2015, Mignot ve Nöhlmann, 2017).

Birçok mikroorganizma, geleneksel olarak biyolojik veya biyolojik olmayan yüzeylere yapışan matriks ile çevrelenmiş mikrobiyal birikimler olarak tanımlanan biyofilm oluşturur. Bu hücre kümeleri çoğunlukla birden fazla türden oluşur ve hücrelerin antimikrobiyallerden, avcılardan ve diğer çevresel tehlikelerden korunmasını, ayrıca yeni nişleri kolonileştirmek üzere çevreye dağılmasını sağlar. Diğer hücreler bu biyofilmlerin üretimini engellemek üzere rekabet stratejilerine başvururlar (Hall-Stoodley ve diğ., 2004, Stacy ve diğ., 2016). Örneğin, *Escherichia coli* hücreleri, *Staphylococcus aureus* ve *Pseudomonas aeruginosa*'da biyofilm

oluşumunu inhibe eden yüzey aktif maddeler ve EPS üretir (Valle ve diğ., 2006, Rendueles ve diğ., 2011).

Aktif rekabet, rakip hücrelerin birbirlerini ortadan kaldırmak için aktif olarak veya kimyasal savaş yoluyla birbirlerine zarar verdiği rekabet biçimidir. Bu rekabet biçimi, bakteriyosinlerden peptidlere ve antibiyotiklere kadar geniş yelpazede değişen antimikrobiyallerin üretilmesi yoluyla gerçekleşir (Chao ve Levin, 1981, Riley ve Gordon, 1999; Ghoul ve Mitri, 2016). Antimikrobiyal bileşikler, farklı türler arasında, aynı türün ilgili türleri arasında ve ayrıca bir popülasyondaki genetik olarak özdeş bireyler arasında rekabete aracılık edebilir.

Aktif rekabetinin mekanizmaları arasında, çeşitli Gram negatif bakteri türlerinin etkileşimlerine aracılık eden tip VI salgılama sistemleri (T6SS) de yer almaktadır. T6SS, virülans faktörlerinin, şırınga benzeri çıkıntılarla, komşu hücrelere enjekte edildiği özel salgı sistemleridir. Bu sistemler hem ökaryotik hem de prokaryotik hücreleri hedefleyebilmektedir. Bu nedenle patogenez ve/veya komşu bakterilere karşı rekabet için gereklidir (Felisberto-Rodrigues ve diğ., 2011; Russell ve diğ., 2014; Borgeaud ve diğ., 2015).

Çok sayıda rekabet stratejisinin evrimsel olarak ortaya çıkışı ve korunmuş olması, bu stratejilerin mikrobiyal ekosistemdeki merkezi rolünü yansıtır. Mikrobiyal rekabet hem çevremiz hem de kendi mikrobiyomumuz içinde bizi etkileyen türler arası dengenin ayrılmaz bir parçasıdır. Bununla birlikte, bu metabolitlerin işlevlerinin pek çok bakımdan aydınlatılması gerekmektedir. Mikrobiyal gruplarda yapılacak analizlerle rekabetçi etkileşimlerin daha iyi anlaşılması, yalnızca biyolojinin farklı yönlerine derinlemesine bir bakış sağlamakla kalmayacak, aynı zamanda terapötik yaklaşımlarda yeni gelişmeleri de şekillendirecektir.

2.2.KO-KÜLTÜR SİSTEMLERİ

Robert Koch'un 1880'li yıllarda saf bakteri kolonilerini ilk kez kültüre almasının ardından mikroorganizmaların katı veya sıvı ortamda aksenik kültürlenmesi (saf halde kültürlenmesi), mikrobiyolojide standart ve yeri doldurulamaz bir rutine dönüşmüştür. Mikrobiyolojinin bir bilim olarak ortaya çıkmasından bu yana, bilim insanları mikroorganizmaları çoğunlukla saf kültürler olarak yetiştirmeye devam etmiştir. Bu da mikrobiyal dünyaya sınırlı bir bakış açısı sağlamıştır (De Kruif, 1926; Nai ve Meyer, 2018). Çünkü doğal ortamlarda mikroorganizmalar genellikle, klonal popülasyonlardan (hücrelerin, kendi genetik materyalinin aynısını taşıyan başka hücreler üretmesi) daha çeşitli ve karmaşık görevleri yerine getirme yeteneğine sahip çok

sayıda türün toplulukları olarak bulunurlar (Brune ve Bayer, 2012) ve kendi ortamlarında gerçekleştirdikleri mikrobiyal etkileşimler, organizmaların hayatta kalmaları için kritik öneme sahiptir.

Bu etkileşimlere ikincil metabolitler, çeşitli sinyal algılama molekülleri ve peptitler gibi moleküller aracılık eder (Fuqua ve Greenberg 2002; Waters ve Bassler, 2005; Oh ve diğ., 2007). Bütün mikroorganizmalar arasında gerçekleşen bu etkileşimler içerisinde bakteri-bakteri (Mearns-Spragg ve diğ., 1998), bakteri-mantar (Cueto ve diğ., 2001; Park ve diğ., 2011) ve mantar-mantar (Zhu ve diğ., 2013) etkileşimleri de bulunmaktadır. Mikrobiyal genom dizileme çalışmaları, özellikle bakteri ve mantarların genlerinin %10-15 gibi önemli sayılabilecek bir kısmını, ikincil metabolizmaya ayırdığını göstermektedir. Bu değer laboratuvar araştırmalarının öngörebileceğinden çok daha fazladır. Şaşırtıcı bir şekilde, bu genlerin çoğu sessizdir, yani laboratuvar yetiştirme koşulları altında anlatımı yapılmaz (Sanchez ve diğ., 2012; Brakhage, 2013; Inglis ve diğ., 2013).

Mikroorganizmaların, fazla mikro/makro besin, yüksek su aktivitesi, sabit sıcaklık, tamponlanmış pH gibi, ideal laboratuvar koşullarında üretilmesi, onların doğal ekosistemlerinden uzakta oldukları anlamına gelir. Organizmalar mikrobiyal dünyasından ve rakiplerinden izole edildikleri için, laboratuvarlarda kullanılan geleneksel saf kültürleme teknikleri, küçük moleküllerin aracılık ettiği etkileşimleri hesaba katmaz, bu da etkileşimlerin kesin yapısının büyük ölçüde bilinmemesine neden olmaktadır (Park ve diğ., 2011; Nai ve Meyer 2018).

İkincil metabolitlerin üretiminde mikrobiyal etkileşimin önemi göz önüne alındığında, mikroorganizmalar doğal ürün keşfi bakımından bir hazine sandığını temsil eder. "Karma kültürler" üzerine rapor edilen ilk çalışma 1918'e kadar uzanmaktadır. Bu çalışmada *Escherichia coli* ve *Bacillus paratyphosus*'un ortak kültürleri analiz edilmiştir ve "bu araştırmalarla bakteri kültürü içindeki biyokimyasal ve fizyolojik süreçlerle ilgili bazı özel materyallerin elde edilebileceği umulmaktadır" sonucuna varılmıştır. Günümüzde ise hala mikrobiyoloji, biyoteknoloji ve doğal ürün keşfi alanlarında çalışan araştırmacılar, bu çalışmaları takip etmenin bir yolu olarak birlikte çoğaltma yaklaşımını araştırmaya devam etmektedir. Bu çalışmalar terminolojik olarak ko-kültüvasyon, ko-kültür, ortak kültür, ortak çoğaltma, ikili kültür, heterokültür, heterotipik kültür, karma kültür, ya da karışık kültür olarak karışımıza çıkabilir. Bu durum ortak kültür teknolojilerinde kafa karışıklığına sebep olabilir.

(Fischer, 1918; Goers ve diğ., 2014; Nai ve Meyer 2018). Bu tez kapsamında birlikte kültürleme, ko-kültür olarak ele alınmaktadır.

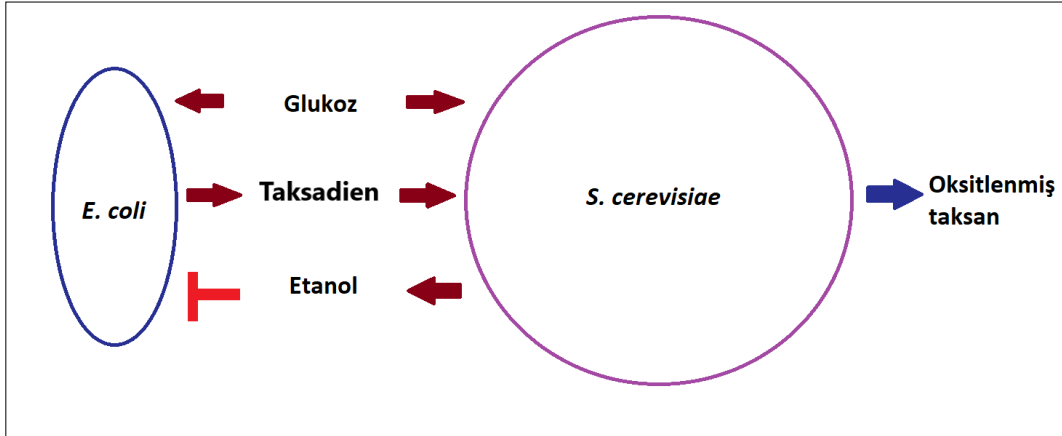
Ko-kültür sistemleri, doğada bulunan mikroorganizma topluluklarından esinlenerek oluşturulmuş, iki ya da daha fazla sayıda farklı hücre popülasyonunun, laboratuvar koşulları altında, bir arada üretildiği sistemlerdir. Bu şekilde kurulan düzeneklerle popülasyonlar arasındaki doğal etkileşimlere ilişkin çalışmalar laboratuvar koşullarında yapılabilmekte ve doğada gözlenmeyen sentetik etkileşimler sağlanabilmektedir. Ko-kültür sistemleri, hücre popülasyonları arasındaki etkileşimleri incelemek için uzun zamandır kullanılmakta olan ve neredeyse her türlü hücre-hücre etkileşimi çalışmaları için ideal sistemlerdir (Bertrand ve diğ., 2014; Goers ve diğ., 2014).

Çalışılan türün dışında kalan canlı organizmalardan arınmış tekniklerden, karışık kültürlere geçiş mikroorganizmalar arası etkileşimin tam olarak anlaşılmasına izin verebilir. Doğal ürün keşfi, mikrobiyal ekoloji, evrim ve patogeneze çalışmalarını bakımından son derece önemli sonuçlar doğurabilir (An ve diğ., 2006; Gore ve diğ., 2009; Nai ve Meyer 2018). Dolayısıyla bu sistemlerin temel araştırmalar için muazzam bir potansiyele sahip olduğu düşünülmektedir ve asıl amacı endüstriyel, çevresel ve tıbbi uygulamalarda toplumsal fayda sağlamak olan sentetik biyoloji çalışmaları için büyük önem taşımaktadır (Chen, 2012; Kitney ve Freemont 2012).

Genomik çalışmalar belirli bakteri ve mantar gruplarının, standart laboratuvar büyüme koşulları altında ifade edilmeyen düzinelerce ikincil metabolit yolağına sahip olduğunu göstermektedir (Pettit, 2009; Scherlach ve Hertweck 2009). Mantarların, aktinomisetlerin ve miksobakterilerin genomları, temel işlevler için gerekenden çok daha büyük olduğundan, genomlarının bir kısmının alternatif metabolik yolları kodladığı varsayılmaktadır (Knight ve diğ., 2003). Mikroorganizmaların metabolik potansiyellerini daha iyi anlamak için geliştirilmiş bir yaklaşım olarak; karışık kültürlerin kullanılması önerilmektedir. Çünkü bu yaklaşımla, diğer organizmaların varlığında, ikincil metabolit sentezinin indüklenebileceği düşünülmektedir (Pettit, 2009). Ayrıca mikroorganizmaların birlikte üretilmesi gen mutasyonuna ve sessiz gen kümelerinin anlatımına veya tüm gen parçalarının değişimine (yatay gen transferi) neden olabilir, bu da antibiyotik gibi önceden keşfedilmemiş kimyasal yapıların üretilmesine neden olabilir (Kurosawa ve diğ., 2008; Charusanti ve diğ., 2012). Mikrobiyal ortak kültürler, mikroorganizmalar arasında çoğunluk algılanması olarak da ifade edilen Quorum Sensing (QS)

modülasyonunu keşfetmek için de kullanılmıştır. Çoğu hastalık QS aracılı biyofilmler içinde çoğalan bakterilerden kaynaklanmaktadır. Bu sebeple araştırmacılar biyofilm tabakasını önlemeye yönelik çalışmalarda öncelikli olarak QS sistemini modüle etmeye odaklanırlar (Kalia, 2013). Ayrıca biyofilm toplulukları gibi yerel mikrobiyal popülasyon yoğunlukları yüksek olduğunda, rekabetçi etkileşimlerin meydana gelmesi daha olası olduğ için QS modülasyonu yeni antibiyotik ve terapötik madde arayışlarında da kullanılmaktadır.

Biyoteknolojide mikrobiyal ko-kültürlerin kullanılması çok önemli bir yere sahiptir. Bu süreçte kullanılan suşların metabolik yollarının sinerjistik etki potansiyeli olması nedeniyle ko-kültürler mono kültürlerle göre oldukça avantajlıdır. Ko-kültürlerle yapılan biyoteknolojik çalışmalarda ürün verimliliğini arttırmak, kültür başarı ve davranışlarını iyileştirmek amaçlanmaktadır (Goers ve diğ., 2014; Zhang ve diğ., 2017). Endüstriyel ürün eldesinde ko-kültür sisteminin önemi her geçen gün artmakta olup bu sistemlerle uzun metabolik yola sahip ürünlerin tek kültürlü bir sistem kullanılarak üretilmesinde kolayca çözilemeyen sorunların üstesinden gelmek mümkün kılınmıştır. Örneğin Zhou ve diğerleri (2015), anti-kanser ilacı olan paklitakselin öncülerini üretmek için *E. coli* ve *S. cerevisiae*'nin mutualist yaşadıkları ko-kültür sistemini geliştirmiş, bir metabolik ara ürün olan taksadien sentezlemek üzere tasarlanan mikrobiyal ortaklıkta, heterolog bir metabolik yol oluşumunu göstermişlerdir.



Şekil 2.1 : Paklitaksel öncüleri üretmek için ko-kültür tasarımı Zhou ve diğerlerinden (2015) alınmıştır.

Başka bir çalışmada ise sinerjistik ko-kültür sistemi ile ksilozdan naringenin üretimi geliştirilmiş ve uzun bir metabolik yol yeniden yapılandırılmıştır. Bu çalışmada *E. coli* ve *S. cerevisiae* ko-kültürü kullanılarak, çeşitli biyoteknolojik uygulamalarda kullanılan değerli bir flavonoid olan naringenin heterolog üretimi sağlanmıştır (Zhang ve diğ., 2017).

Zhang ve diğ erleri (2015) yaptıkları çalışmada farklı *E. coli* suşları kullanarak geliştirdikleri ko-kültür biyoreaktör sistemlerinde endüstriyel öneme sahip cis,cis-mukonik asit ve 4-hidroksibenzoik asit moleküllerinin yüksek miktarda üretimlerini sağlamışlardır. Bu şekilde yapılan ko-kültür çalışmalarında; farklı mikroorganizmaların özelliklerinden ve işlevlerinden yararlanılmakta, verimliliği artırmak için ko-kültür üyeleri arasında faydalı etkileşimler keşfedilmekte, aynı zamanda geri besleme mekanizmasından kaynaklanan sorunlar en aza indirgenmektedir.

İki veya daha fazla mikroorganizmanın birlikte kültürlenmesi, gıda üretimi de dahil olmak üzere çeşitli biyoproseslere yaygın olarak uygulanan önemli bir fermantasyon tekniğidir. Amino asitler, nükleotidler, antibiyotikler ve enzimler gibi birçok madde tek bir mikroorganizma kullanılarak başarıyla üretilse de geleneksel içeceklerin veya yiyeceklerin (peynir, yoğurt, lahana turşusu, ekşi hamur, salam, bira, viski ve şarap gibi) fermantasyonu sırasında karmaşık substratları verimli bir şekilde kullandıkları için sıklıkla birden fazla mikroorganizma kullanılır. Bunun dışında ortak kültür sistemleri endüstriyel olarak atık su arıtımı, biyogaz ve biyoalkol üretimi, biyolojik toprak ıslahı üretiminde uygulanmaktadır (Taniguchi ve Tanaka, 2004; Bader ve diğ., 2010).

Ko-kültür sistemleri kullanılarak enfeksiyon mekanizmalarını keşfetme (Cottet ve diğ., 2002) yapay doku yapımına yönelik girişimler ve terapötik özellikli bileşikler bulma ve geliştirme (Moraes ve diğ., 2012; Kim, 2005) çalışmaları daha etkin biçimde yapılmaktadır. Özellikle ilaç araştırmalarında ko-kültür sistemleri oldukça önem arz eder, çünkü hayvan modellerine göre in vivo koşullara daha çok benzeyen bir doku modelini temsil ederler ve hücre-hücre etkileşimleri üzerindeki yüksek etkili testler ve ilaç etkilerinin ayrıntılı izlenmesine izin verirler (Wu ve diğ., 2010).

Mikrobiyal suşlar ve ürünleri analiz edildikten sonra, toplanan veriler değerlendirilmelidir. Ortak kültür deneylerinde amaç, de novo olarak üretilen veya türler arası rekabete göre düzenlenen ikincil metabolitleri ortaya çıkarmaktır. Güçlü bir şekilde indüklenen bileşikleri tanımlamak için kromatografik yöntemler yeterli olabilir. Çoğu durumda, bu metodoloji, ko-kültürlerde tespit edilen ancak saf suşların kültürlerinde tespit edilemeyen bileşiklerin seçimine izin verir. Kütle spektrometrisi (MS) ile büyük veri kümeleri oluşturulur ve ana metabolitlere ek olarak küçük bileşenler hassas ve seçici bir şekilde tespit edilebilir. Benzer şekilde, güçlü bir

iyonun neden olduğu indüksiyon, toplam MS spektrumlarının veya LC-MS kromatogramlarının karşılaştırılmasıyla doğrudan gözlemlenebilir (Bertrand ve diğ., 2014).

2.3. *Shizosaccharomyces pombe*

“Fisyon mayası” olarak da adlandırılan *Schizosaccharomyces pombe* morfolojik olarak çubuk şeklinde, Ascomycetes sınıfına ait, fakültatif, ökaryotik, hareketsiz, tek hücreli mantarlardır (Egel, 2004; Hoffman ve diğ., 2015).

S. pombe ilk kez 1893 yılında Paul Lindner tarafından doğu Afrika darı birası olan Bantu bira örneklerinden izole edilmiş (Slooff, 1970; Munz ve diğ., 1989) ve fisyonla (Schizo ...) bölünen bir maya (... saccharomyces) anlamına gelen bileşik bir taksonomik isim olan *Schizosaccharomyces* adı ile tanıtılmıştır (Egel, 2004).

S. pombe'nin moleküler biyoloji ve genetik araştırmalarda kullanılmaya başlama tarihi ise, Urs Leupold'un, Lindner'in *liquefaeius* kültüründen suş almasıyla birlikte 1950'li yıllara dayanmaktadır. Leupold çalışmalarında, sırasıyla yüzde 90 ve yüzde 40 ascospore oluşumu ile karakterize edilen iki homotalik çiftleşme türü olan 968 h90 ve h40 suşlarını izole etmiş (ancak h40 daha sonra kaybolmuştur) ve iki zıt çiftleşme türü olan heterotalik 972 h- ve 975 h+ suşlarını tanımlamıştır. 968 h90 kendi kendine eşleşebilirken, 972 h- ve 975 h+ yalnızca birbirleri ile eşleşip diploid hücre oluşturabilirler (Leupold, 1993; Gutz ve diğ., 1974; Egel, 2004).

S. pombe'nin yaşam döngüsü aseksüel (vejetatif veya eşeysiz) üreme ve seksüel (eşeyli) üreme süreçlerinden oluşmaktadır. Aseksüel evrede hücreler, normal şartlarda haploid yapıdadır. Özellikle azot kaynağının eksik olması gibi besin açlığının eşleşmeyi teşvik ettiği durumlarında, ortamda karşı eşey tipinde hücreler bulunuyorsa seksüel üreme gerçekleşir (Hoffman ve diğ., 2015). Yabani tip *S. pombe* hücreleri besin açısından zengin ortamda, logaritmik fazda, yaklaşık olarak 8-14 µm uzunluğunda ve 3-5 µm çapındadır. Hücreler büyüme ve bölünme süreçleri boyunca çapları değişmeden, apikal kısımlara doğru uzamaya devam ederler ve medial fisyon ile bölünerek eşit büyüklükte iki yavru hücre meydana getirirler, bu durumda hücrenin yaşı sadece uzunluğunun ölçülmesiyle belirlenebilir (Sabatinos ve Forsburg 2010; Hoffman ve diğ., 2015).

Üssel olarak büyüyen yabani tip hücrelerde hücre döngüsü gelişmiş ökaryotların hücre döngülerine benzer şekilde G1, S ve G2 evrelerini içeren interfaz ve mitoz evrelerinden oluşur (Hoffman ve diğ., 2015). Haploid hücreler bulundukları kültürlerde besin açlığına maruz kaldıklarında ve karşı eşey tipinden hücre bulunmadığında, hücre döngüsünden çıkarak durağan faza girerler. *S. pombe* farklı olarak nitrojen açlığı durumunda G1'de tutuklanırken, Glukoz açlığı durumunda G2'de tutuklanır (Costello ve ark. 1986). Seksüel üreme ise, karşı eşey tipindeki iki hücrenin olması durumunda gerçekleşir. İki eşey tipindeki hücreler kaynaşır ve diploid yapıdaki zigot meydana gelir, zigotun mayoz bölünme geçirmesi ile bir askus içerisinde haploid yapı 4 adet askospor oluşur. Askus çeperinin parçalanması ile de sporlar serbest kalır ve şartlar olgunlaştığında mitoz bölünmeler geçirerek yeni haploid hücreleri meydana getirirler. (Gutz ve diğ., 1974; Egel, 2004; Hoffman ve diğ., 2015).

S. pombe veritabanı olan PomBase (<http://www.pombase.org>) güncel verileri temel alındığında, haploid *S. pombe* genom boyutu 12.57 Mbp'dir, kromozom sayısı 3'tür ve 5118 tane protein kodlayan gene sahiptir, mitokondriyal genomu ise 19.43 kbp boyutundadır (Lock ve diğ., 2018). *S. pombe*, genomu dizilenen altıncı model organizmadır ve tüm genom dizisi Londra'daki Nurse at the Imperial Cancer Research Fund'da (şimdi Cancer Research UK) ve Wellcome Trust Sanger Enstitüsü'nden Bart Barrell başkanlığındaki bir ekip tarafından 2001 yılında tamamlanmıştır (Wood ve diğ., 2002). Dizilemenin tamamlanması, sofistike araştırma metodolojilerinin mevcudiyeti ve ökaryotik hücre süreçlerinin işlevsel ve karşılaştırmalı çalışmaları, günümüzde *S. pombe*'yi yeri doldurulamaz bir model organizma haline getirmiştir.

1970'lerde ve 1980'lerde *S. pombe* ile yürütülen ve hücre döngüsü çalışmaları ile Paul Nurse 2001 yılında Nobel Fizyoloji veya Tıp Ödülüne layık görülmüştür (Nurse, 2002; Fantès ve Hoffman, 2016). Tek hücreli, ökaryotik *S. pombe*'nin haploid ve diploid genoma sahip olması biyolojik süreçlerde yer alan genleri tanımlayan nadir mutantların keşfedilmesine ve genetik çaprazlamaların kolaylıkla yapılabilmesine olanak verir (Hoffman ve diğ., 2015). *S. pombe* bitki ve hayvan türleri ile önemli derecede korunmuş genler içerir, *S. pombe* protein kodlayan genlerinin %69'unun insanda ortologu bulunmaktadır ve bunların bir kısmının insan hastalıklarıyla ilişkili olduğu tespit edilmiştir (Lock ve diğ., 2018).

2.4. *Escherichia coli DH5a*

Escherichia coli 1884'te Alman mikrobiyolog ve çocuk doktoru Theodor Escherich tarafından keşfedilmiştir (Escherich, 1988; Shulman ve diğ., 2007). *E. coli* birçok besin üzerinde kolayca üreyebildiği, çoğu suşu patojenik olmadığı ve hemen hemen her insandan izole edilebildiği için mikrobiyologların 20. yüzyılın başlarında yaptıkları çalışmalarda en yaygın olarak tercih ettikleri seçeneklerden biri haline gelmiştir. 1940'lara gelindiğinde hala pek çok temel araştırmada kullanılıyor olması, onu 1950'lerde gerçekleşen moleküler biyoloji devriminin başlangıcında, çalışılması gerektiği çok açık olan organizmalardan biri yapmıştır (Blount, 2015).

E. coli filogenetik olara Enterobacteriaceae'nin bir üyesidir. Tipik bir Gram-negatif basildir, yaklaşık olarak 1 µm uzunluğunda ve 0,35 µm genişliğindedir, ancak bu ölçüler, suşa ve koşullarına bağlı olarak önemli ölçüde değişebilmektedir. Çevresinde hareket etmek için kullandığı kırbaç benzeri kamçıya veya yüzeylere veya diğer hücrelere yapışmasına izin veren saç benzeri pili yapılarına sahip olabilir. Fizyolojik olarak, fakültatif bir aerobiktir, yani oksijen varlığında veya oksijen olmadan büyüyebilir, ancak aşırı sıcaklık veya pH değerlerinde üreyemez, fotosentez yapamaz (Brenner ve diğ., 2004; Shulman ve diğ., 2007).

E. coli, çoğu suşu patojenik olmayan bir bakteridir ve insan bağırsağında kommensalist yaşar. Bununla birlikte bazı suşları gıda-orjinli patojen potansiyelindedir ve bağırsaklarda güçlü endotoksin üretme faaliyetleri gösterebilir. Yaklaşık olarak 200 patojenik *E. coli* suşu bulunmaktadır ve bunlar üriner sistem enfeksiyonları ve diyare hastalıkları gibi yaşamı tehdit eden enfeksiyonlara sebep olabilir (Madıgan ve Martinko, 2006). *E. coli* hayatta kalma kabiliyeti çok yüksek, oldukça rekabetçi bir organizmadır (Füchslin ve diğ., 2012).

Kromozom dizisi saptanan ilk prokaryot organizmalar arasındadır ve genom dizisi 1997'de tamamlanmıştır. 4,6 milyon baz çifti uzunluğunda halkasal bir DNA'ya sahiptir. 4288 protein kodlayan gene sahip olduğu ve genomunun önemli oranda tekrarlı diziler, transpozabl genetik elementler ve bakteriyofaj kalıntıları içerdiği saptanmıştır (Blattner ve diğ., 1997).

E. coli DH5a transformasyon verimliliğini arttırmak için *E. coli K-12* suşundan tasarlanmış bir organizmadır. RecA1, endA1 ve mavi beyaz taramayı sağlayan lacZΔM15 olmak üzere üç mutasyona sahiptir. RecA1 mutasyonu, rekombinazların aktivitesini devre dışı bırakmak ve

homolog rekombinasyonu inaktive etmek için hazırlanmış bir nokta mutasyonudur (Bryant, 1988).

Çok dayanıklı ve çalışılması kolay bir organizma olması, onu en yoğun şekilde incelenen ve en iyi anlaşılan organizma haline getirmiştir. Günümüzde ise hala en iyi karakterize edilen organizma olarak kullanılmaya devam etmektedir. Genetik kodlama, transkripsiyon, translasyon ve replikasyon dâhil olmak üzere yaşamın en temel yönlerinin ilk çalışıldığı organizma olan *E. coli* ortaya çıkan bilgi ve teknolojik gelişmeler ile akademik ve ticari çalışmalarda, bakteri fizyolojisi, mikrobiyoloji, genetik ve biyokimya, farmasötik üretim ve deneysel mikrobiyal evrim çalışmalarında önemli ölçüde kullanılmaktadır. Özellikle rekombinant DNA çalışmalarında konak organizma olarak kullanılması nedeniyle genetik mühendisliği araştırmaları ve uygulamaları için en çok tercih edilen organizmalardan birisidir. (Singleton, 1999; Madıgan ve Martinko, 2006; Shulman ve diğ., 2007).

3. MALZEME VE YÖNTEM

3.1.ORGANİZMA VE BESİYERİ

Bu çalışmada Fungi aleminin Ascomycetes sınıfına ait, tek hücreli ve ökaryotik bir maya türü olan *Schizosaccharomyces pombe* Lindner liquifaciens'in yabani tipi (972 h-) ve *Escherichia coli* DH5 α suşu kullanıldı (Tablo 3.1). Çalışmada kullanılan *S. pombe* yabani ırkı (972 h-) ve *E.coli* DH5 α suşu İ.Ü. Fen Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü kültür koleksiyonundan temin edildi.

Tablo 3. 1: Çalışmada kullanılan *S. pombe* ve *E. coli* ırklarının özellikleri.

Irklar	Özellikleri
<i>S. pombe</i> 972h-	Yabani ırk
<i>E. coli</i> DH5 α	F/endA1hsdR17(r _k m _k ⁺)supE44thi ⁻ 1recA1 gyrA(nal ^r)relA1 Δ (lacZYA ⁻ arg FU169deoR[ϕ 80 dLac Δ (LacZ)M15]

Çalışma kapsamında *S. pombe* hücreleri Gutz ve diğ. (1974)'nin, *E. coli* DH5 α hücreleri ise Sambrook ve Russell (2001)'in önerdiği besi ortamlarında üretildi.

S. pombe ve *E. coli* DH5 α suşu hücrelerinin ayrı ayrı üretilmesinde ve ko-kültürün kurulmasında kullanılan besiyerleri ve içerikleri Tablo 3.2'de verilmiştir. *E. coli*'nin üretilmesi ve saklanması Luria-Bertani (LB) besiyeri kullanılırken, *S. pombe*'nin üretilmesi ve saklanması Maya özütü katı besiyeri (YEA) ve çoğaltılmasında %3 Glukoz İçeren Maya Özütü Sıvı Besiyeri (YEL) kullanıldı. Ko-kültür ise %0,1 Glukoz İçeren Maya Özütü Sıvı Besiyeri (YEL)'nde kuruldu.

Besiyerleri Tablo 3.2'deki oranlarda dikkatli biçimde hazırlandıktan sonra hazırlandıktan sonra otoklavda 15 dakika boyunca 121°C'da, 1.2 atmosfer basınç altında steril edildi.

Tablo 3. 2: Çalışmada kullanılan besiyeri ve içerikleri.

Besiyerleri	İçerikleri
Luria-Bertani (LB) (pH 7.2)	Tryptone 2 g
	Maya özütü (Yeast Extract) 1 g
	Sodyum klorür 2 g
	dH ₂ O ile 200 mL'ye tamamlanır
Maya özütlü katı besiyeri (YEA) (1 L)	Maya özütü (Yeast Extract) 5 g
	Glukoz 30 g
	Agar 20 g
	dH ₂ O ile 1000 mL'ye tamamlanır
%3 Glukoz İçeren Maya Özütü Sıvı Besiyeri (YEL)	Maya özütü (Yeast Extract) 5 g
	Glukoz 30 g
	dH ₂ O ile 1000 mL'ye tamamlanır
%0,1 Glukoz İçeren Maya Özütü Sıvı Besiyeri (YEL)	Maya özütü (Yeast Extract) 5 g
	Glukoz 1 g
	dH ₂ O ile 1000 mL'ye tamamlanır

3.1.1. Organizmaların Üretilmesi ve Saklanması

Tüm aşamalarda aseptik tekniklere dikkat ederek yabani tip *S. pombe* hücreleri +4 °C'da silika jelde saklanan stoklardan alınarak YEA besiyerine ekildi ve 30 °C'da 2 gün boyunca üremeye bırakıldı. 2 gün sonrasında üreyen hücrelerden azaltma ekim yapılarak tek koloniler elde edildi. Elde edilen kolonilerden biri seçilerek steril başka bir YEA besiyerine ekildi 30 °C'de 2 gün üremeye bırakıldı, böylece çalışmada kullanılacak stok hücreler tek koloninin çoğaltılması ile sağlandı.

E. coli DH5a suşu gliserol stoklardan alınarak 5 ml LB besiyerine ekildi, 37 °C'de 150 rpm'de çalkalamalı etüvde bir gece üremeye bırakıldı.

Çalışma boyunca *S. pombe* hücreleri katı, *E. coli* hücreleri sıvı besiyerinde +4 °C’da saklandı.

3.1.2. Ko-kültürün Kurulması

+4 °C’da katı YEA’da saklanan *S. pombe* hücreleri sürme tekniğiyle yeni bir YEA’ya ekilerek 30 °C’de 2 gün üremeye bırakıldı. YEA’da üreyen hücreler, başlangıç hücre sayısı 10^6 hücre/ml olacak şekilde 5 mL YEL’e ekildi ve 30 °C’da, 180 rpm’de çalkalamalı etüvde bir gece üremeye bırakıldı ve ko-kültür ekimleri yapıldı.

+4°C’da sıvı LB’de saklanan *E. coli* hücreleri taze 5 ml LB’ye ekildi ve 37 °C’de üremeye bırakıldı. *E. coli* hücrelerinin durağan faza geçmemesi için OD_{600 nm}’de de 0,6’yı geçmemesi gerekmektedir. 200 µl OD_{600 nm}’de de 0,5 değerindeki *E. coli* hücre sayısı yaklaşık olarak 10^6 h/ml’ye denk gelmektedir.

LB’ye ekilip, 37 °C’de üremeye bırakılan *E. coli* hücrelerinin, blank olarak steril LB kullanılarak OD ölçümleri belirli saat aralıklarıyla yapıldı ve OD değeri yaklaşık olarak 0,5 iken ko-kültür ekimleri başlatıldı.

Ko-kültür deney setlerinde kontrol grubu olarak *S. pombe* ve *E. coli* saf kültürleri ayrı ayrı kullanıldı. Ko-kültür ise $2 \cdot 10^6$ h/ml *S. pombe* ve 10^6 h/ml *E. coli* olacak şekilde başlatıldı. *S. pombe* kontrol grubu için 10 ml %0,1 glukoz içeren YEL besiyerine $2 \cdot 10^6$ h/ml *S. pombe* ekildi, *E. coli* kontrol grubu için 10 ml %0,1 glukoz içeren YEL besiyerine 10^6 h/ml *E. coli* ekildi. Ko-kültür seti için 10 ml %0,1 glukoz içeren YEL besiyerine $2 \cdot 10^6$ h/ml *S. pombe* ve 10^6 h/ml *E. coli* hücreleri ekildi. Tüm setler 32 °C’da, 180 rpm’de çalkalamalı etüvde inkübasyona bırakıldı.

3.2.PROTEİN ANALİZLERİ

3.2.1. Protein Eldesi

48. saat ve 72. saat sonunda kültürler steril falkonlara aktarıldı. 5000 rpm’de 5 dakika santrifüj edildi ve üst sıvı steril bir falkona alınarak çöken hücrelerden uzaklaştırıldı.

Protein çöktürme işlemi santrifüj sonrasında hücrelerden arınmış olan üst sıvıdan (ekstrasellüler alandan) Wessel ve Flügge’in (1984) önerdiği deterjan ve lipid varlığında seyreltik çözelti içinde proteinin kantitatif geri kazanımı için uygulanan bir yöntem olan metanol-kloroform-su

yöntemi ile yapıldı. Yöntem izole edilen protein miktarını arttırmak için kendi çalışmamıza uygun olarak değiştirildi.

Protein eldesi için steril falkonlara her bir falkonda 1 ml örnek olacak şekilde üst sıvı bölündü. 1ml örnek üzerine 4 ml metanol eklendi ve tüp vortekslendi. Daha sonra tüpe 1 ml kloroform eklendi ve tekrar vorteks yardımıyla karıştırıldı. Ardından 3 ml dH₂O eklendi ve tekrar vortekslendikten sonra 10000g'de 10 dakika santrifüj edildi. Santrifüj işleminden sonra 3 faza ayrılan örneklerden 2.faza kadar olan üst sıvı uzaklaştırıldı. (Bu aşamada proteinler 2.fazda toplanmaktadır.) Ardından tüpe 4 ml metanol eklendi ve tekrar vorteks yardımıyla karıştırıldı. Tekrardan 10000g'de 10 dakika santrifüj edildi. Üst sıvı tamamen uzaklaştırıldı ve metanolün uçması beklendi. Akabinde dibe çökmüş olan protein örnekleri 50-200 ul %1 SDS içinde çözündürüldü. Bu aşamadan sonra protein miktar tayini gerçekleştirildi.

3.2.2. Protein Konsantrasyonunun Saptanması

Elde edilen protein konsantrasyonlarını belirlemek için SMART™ BCA (bişinkoninik asit) Protein Assay Kit (iNtRON Biotechnology) kullanıldı.

Kullanılan testin prensibi, alkali koşullar altında Cu (II) iyonları ile protein kompleksinin oluşumuna ve ardından Cu (II) iyonlarının Cu (I) iyonlarına indirgenmesine dayanır. İndirgenme miktarı, mevcut protein miktarı ile orantılı olmaktadır. BCA suda çözünen kararlı bir bileşiktir, alkali ortamlarda Cu (I) ile mor bir kompleks oluşturur ve bu kompleks spektrometrede 562 nm'de maksimum absorbans gösterir. Bu şekilde protein miktarı bilinmeyen örneklerin, miktarı bilinen protein standartları ile karşılaştırılarak spektrofotometrik olarak konsantrasyonlarının belirlenmesi sağlanır (Walker, 1994).

Protein konsantrasyonu ölçümünde gerçekleştirilen adımlar üretici firmanın protokolüne uygun olarak gerçekleştirildi. Kit içerisinde bulunan BSA ("Bovine Serum Albumin", Sığır Serum Albümini) kitin talimatlarına uygun oranda seyreltildi ve standartlar hazırlandı. Seyreltme işlemi dH₂O kullanılarak 0-2000 µg / mL (25, 125, 250, 500, 1000, 1500 ve 2000 µg / mL) arasında hazırlandı. Ardından 5 kez dH₂O (boş, numune lizis tamponunun çözücüsü) ile seyreltildi. 200 µL BCA reaktifi (kit içerisinde bulunmaktadır) 96 kuyucuklu mikro-plakanın kuyucuklarına eklendi. BCA reaktifine 25 µL seyreltilmiş örnekler ve boş örnek eklendi. Mikro-plaka bir orbital platform çalkalayıcıda (Heidolph Unimax 1010) bir dakika çalkalandı. Daha sonra bir inkübatörde (Thermo Scientific, Heracell™ 240) 37 °C'de 30 dakika inkübe

edildi. Son olarak, örnekler absorbansı, 562 nm dalga boyunda spektrometre cihazı (EON, BioTek Instruments Inc.) kullanılarak ölçüldü.

Tüm örnekler ve standartlar 3 tekrarlı olarak ölçüldü. BSA standartlarının konsantrasyon ve absorbans değerleri kullanılarak standart bir eğri oluşturuldu. Protein konsantrasyonları, protein örneklerinin absorbans değerleri standart eğriden elde edilen denkleme yerleştirilerek hesaplandı.

3.2.3. SDS-PAGE

Proteinlerin ayrımını gerçekleştirmek için Walker'ın (2002) önerdiği, suda çözünür proteinleri denetüre ederek ayrılmasını sağlayan Sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) yöntemi kullanıldı.

SDS-PAGE proteinlerin moleküler kütlelerine göre ayrılmasına izin verir ve yaklaşık olarak 5 ila 250 kDa arasında iyi bir ayrım gerçekleştirir (Smith, 1984; Walker, 2002). SDS-PAGE sistemi kesikli ve kesiksiz olabilir. Bu sistemler hazırlanırken farklı tamponlar kullanılır. Kesiksiz sistem tek bir ayırıcı jel ile yapılırken, çalışmamızda uygulanmış olan kesikli sistem farklı tamponlarla hazırlanmış iki ayrı jel kısmından oluşur: proteinlerin molekül ağırlıklarına (MW) bağlı olarak ayrıldığı bir ayırma jeli ve proteinlerin ayırma jeline geçmesi için önceden konsantre edildiği bir yükleme jeli.

SDS-PAGE uygulaması için mini jel elektroforez sistemi (Mini-PROTEAN® Tetra Cell, Bio-Rad) kullanıldı. Sisteme ait cam plakalar (1.0 mm), tarak (1.0 mm) ve klipsler kullanım öncesinde %70 etanol (EtOH) ile temizlendi ve tamamen kurutuldu. Kurutma işlemi jel sisteminin herhangi bir toz ya da maddeye maruz kalmaması için steril kabinler içerisinde gerçekleştirildi. Daha sonra jel kaseti üreticinin ürün kılavuzuna uygun olacak şekilde hazırlandı.

SDS-PAGE için kullanılan solüsyonlar ve içerikleri Tablo 3.3'te verilmiştir. İlk olarak steril bir beherde %10'luk ayırma jeli hazırlandı. Ayırma jeli için pH 8.8 Tris-HCl, dH₂O, akrilamid solüsyonu, SDS ve APS Tablo 3.4'te verilen miktarlarda nazikçe karıştırıldı ve ultrasonik su banyosunda 1 dakika kadar bekletildi. Bu şekilde jel solüsyon karışımı içindeki çözünmüş oksijenin karışımdan ayrılması sağlandı. Daha sonra TEMED (Fluka) eklendi ve öncesinde

hazırlanmış olan kasetin 4/5'ini dolduracak şekilde jel karışımı şırınga yardımıyla iki cam plaka (1 mm) arasına hava boşluğu oluşmayacak şekilde döküldü.

Tablo 3. 3 : SDS PAGE solüsyonları ve içerikleri.

Solüsyonlar	İçerikleri
%30 Akrilamit Stok Solüsyonu	Akrilamit (Sigma-Aldrich A3553) 30 g Bis-Akrilamit (Sigma-Aldrich M2022) 0.8 g dH ₂ O ile 100 mL'ye tamamlanır
1.875 M Tris-HCL Tamponu (pH 6.8)	Trizma-Base (Sigma-Aldrich T1503) 45.43 g 3N HCl ile pH 8.8'e ayarlanır dH ₂ O ile 100 mL'ye tamamlanır
0.6 M Tris-HCL Tamponu (pH 6.8)	Trizma-Base 14.54 g 3N HCl ile pH 6.8'e ayarlanır dH ₂ O ile 200 mL'ye tamamlanır
%10 Sodyum Dodesil Sülfat (SDS)	SDS (AppliChem A2263) 10 g dH ₂ O ile 100 mL'ye tamamlanır
10% Amonyum persülfat (APS)	APS (AppliChem A2941) 0.1 g dH ₂ O ile 1 mL'ye tamamlanır Taze hazırlanır
1X Yütütme Tamponu (25 mM Tris, 192 mM Glisin, 0.1% SDS, pH 8.3)	Trizma-Baz 3.03 g Glisin (AppliChem A1067) 14.4 g SDS 1 g dH ₂ O ile 1 L'ye tamamlanır
2X Örnek Yükleme Tamponu	0.6 M Tris-HCl Tamponu (pH 6.8) 5 mL SDS 0.5 g Sükroz (Sigma-Aldrich S0389) 14.54 g β-Merkaptoetanol (AppliChem A1108) 0.25 mL Bromo-fenol mavisi (0.5% (w/v) stok, Merck 108122) 5 mL dH ₂ O ile 50 mL'ye tamamlanır

Oksijen, jel polimerizasyonunu inhibe ettiği için, jel yüzeyinin oksijen ile temasını önlemek ve jelin yüzeyinin düz olmasını sağlamak amacıyla jel yüzeyi yaklaşık olarak 1 mL dH₂O ile tamamen kapatıldı ve polimerizasyona bırakıldı.

Polimerizasyon tamamlandıktan sonra, yüzeyde kalan ve sonradan eklenmiş olan su döküldü. Ardından Tablo 3.4'te verilen miktarlarda ayırma jeli için gerekli solüsyonlar kullanılarak ayırma jeli hazırlandı. Yükleme jeli hazırlarken geçerli olan bütün adımlar ayırma jeli hazırlanırken de uygulandı ve hazırlanan jel şırınga yardımıyla polimerize olan ayırma jelinin üzerine döküldü.

Örneklerin yüklendiği kuyucukları oluşturmak için kasetin üstüne dikkatli ve hızlı bir şekilde bir tarak yerleştirildi. Yükleme jeli de polimerize olduktan sonra (yaklaşık 20 dakika), bağlayıcı klipsler ve tarak jel düzeneğinden nazikçe çıkarıldı. Bu aşamada jelin kırılmamasına ve zarar görmemesine dikkat edildi.

Tablo 3. 4 : Ayırma ve yükleme jeli içerik ve miktarları (1 jel için gerekli miktarlar verilmiştir).

Gel İçeriği	Ayırma Jeli (%10 Akrilamit)	Yükleme jeli (%5 Akrilamit)
Tris-HCl (1.875 M, pH:8.8)	1 mL	-
Tris-HCl (0.6 M, pH:6.8)	-	250 µL
dH ₂ O	2.262 mL	1.875 mL
%30 Stok Akrilamit Solüsyonu	1.662 mL	337.5 µL
%10 Sodyum Dodesil Sülfat (SDS)	50 µL	25 µL
%10 Amonyum Persülfat (APS)	25 µL	12.5 µL
TEMED	1.75 µL	3.5 µL

Jel kaseti, 1X tank tamponu ile doldurulmuş olan elektroforez tankına yerleştirildi. Jel kuyuları tampon ile tek tek yıkandı ve kuyular kirlilik veyahut da jel kalıntılarından arındırıldı.

Örnekler, minik santrifüj tüplerine alındı ve ardından 1: 1 (v: v) oranında 2X örnek yükleme tamponu ile karıştırıldı. Örnekler içerisindeki proteinleri tamamen denatüre olması için tüpler 95 °C’de 5 dakika ısıtıcı blokta bekletildi.

Daha sonra örnekler kuyucuklara ayrı ayrı yüklendi. Protein markerı olarak GangNam-STAIN™ Prestained Protein Markerı (İntron Biotechnology, 24052) kullanıldı. Marker, protein ağırlığı 245 kDa ile 11 kDa ağırlığında değişen bantlardan oluşmaktadır. Elektroforez, sabit voltajda (200 V) gerçekleştirildi ve ayırma işlemi, bromofenol mavisinin oluşturduğu bant jelin alt kenarına ulaşana kadar devam ettirildi.

3.2.4. Coomassie Blue Boyama

Jel elektroforezinden sonra, protein bantlarını görünebilir hale getirmek için Coomassie parlak mavisini boyama yöntemi kullanıldı. SDS-PAGE tamamlandıktan sonra jel, aside dayanıklı ve temiz bir plastik kap içerisine alındı.

İçinde jel bulunan kaba, jelin üstünü tamamen kaplayana kadar boyama solüsyonu döküldü ve kap iki saat boyunca oda sıcaklığında orbital platform çalkalayıcıda (Heidolph Unimax 1010) 50 rpm’de çalkalandı. Bu aşamada kullanılan boyama solüsyonu; % 0.05 (w / v) Coomassie parlak mavi R-250 (Merck 112553), 50: 10: 40 (v: v: v) oranında MeOH (Metanol, Sigma-Aldrich 24229) : AcOH (Asetik Asit, Sigma-Aldrich 27225) : dH₂O karışımı ile hazırlanmıştır.

İki saat sonunda jel, yıkama çözeltisine [5: 7: 88 (v: v: v) oranlarında MeOH : AcOH : dH₂O karışımı ile hazırlanmıştır] alındı ve boyadan arındırılana kadar 50 rpm’de çalkalandı. Yıkama çözeltisi bu aşamada belirli aralıklarla değiştirildi ve jelin bant içermeyen kısımları tamamen boyadan arındırılana kadar yıkama işlemi tekrarlandı. Jelde oluşan bantlar, ChemiDoc MP (Bio-Rad) görüntüleme sisteminde, ImageLab 5.2.1 yazılımı kullanılarak görüntülendi.

Görüntülemenin ardından kontrol gruplarından farklılık arz eden ko-kültür’e ait protein bantları steril bir bistüri yardımı ile kesilerek dH₂O içine alındı ve LC-MS/MS analizine yollandı.

3.2.5. LC/MS-MS

Sıvı kromatografi-tandem kütle spektrometrisi (LC-MS/MS), araştırılmak istenen moleküllerin kalitatif ve kantitatif olarak analiz edilmesinde kullanılır. Bu yöntem sıvı kromatografinin (LC) ve kütle spektrometrisinin (MS) birleşmesinden oluşmaktadır. Karmaşık ortamlarda yer alan

tekli veya çoklu moleküllerin analizinde, eser miktardaki maddelerin analizinde, ilaç etken maddelerde ve birçok maddenin analizinde yüksek hassaslık ve doğruluk ile çalışmaktadır.

Bu yöntem düşük moleküler ağırlıklı analitler için immünolojik testlerden veya geleneksel yüksek performans/basınçlı sıvı kromatografisinden (HPLC) daha üstün analitik özgüllük sunmakta ve gaz kromatografisi-kütle spektrometrisinden (GC-MS) daha yüksek verimle çalışmaktadır (Grebe ve Singh, 2011).

Çalışmada hazırlanmış olan protein örneklerinin yüksek verimli analizi için LC/MS-MS, hizmet alımı olarak Acıbadem Üniversitesine bağlı, Acıbadem LabMed firması tarafından gerçekleştirilmiştir.

3.2.6. Proteinlerin Sınıflandırılması ve Fonksiyonlarının Araştırılması

Evrensel Protein Kaynağı (UniProt), protein dizisi ve açıklama verileri için kapsamlı bir kaynaktır. UniProt veri tabanları, bir protein hakkında deneysel olarak doğrulanmış veya hesaplamalı olarak tahmin edilen fonksiyonel bilgilerin bir özetine bağlı şekilde bilinen tüm protein dizisi verilerinin bir özetini sağlar. Bu platform UniProtKB Proteomları aracılığıyla sağlanan tamamen dizili viral, bakteriyel, arkeal ve ökaryotik genomlardan kaynaklanan, bir organizma tarafından eksprese edildiğine inanılan eksiksiz protein seti olan >292.000 proteomlu 189 milyondan fazla dizi kaydı içermektedir (UniProt Konsorsiyum, 2021).

PANTHER (<http://www.pantherdb.org/>) biyologların dizileme, proteomik veya gen ekspresyonu deneylerinden elde edilen büyük ölçekli, genom çapında verileri analiz etmelerini sağlayan gen işlevi, ontoloji, yollar ve istatistiksel analiz araçlarını birleştiren kapsamlı bir sistemdir. Gen ve protein fonksiyonlarını sınıflandırmayı amaçlayan bu sistem, deneysel verileri analiz etmek için çevrimiçi bir kaynak olarak hizmet etmektedir (Thomas ve diğ., 2003; Thomas ve diğ., 2006; Mi ve diğ., 2013).

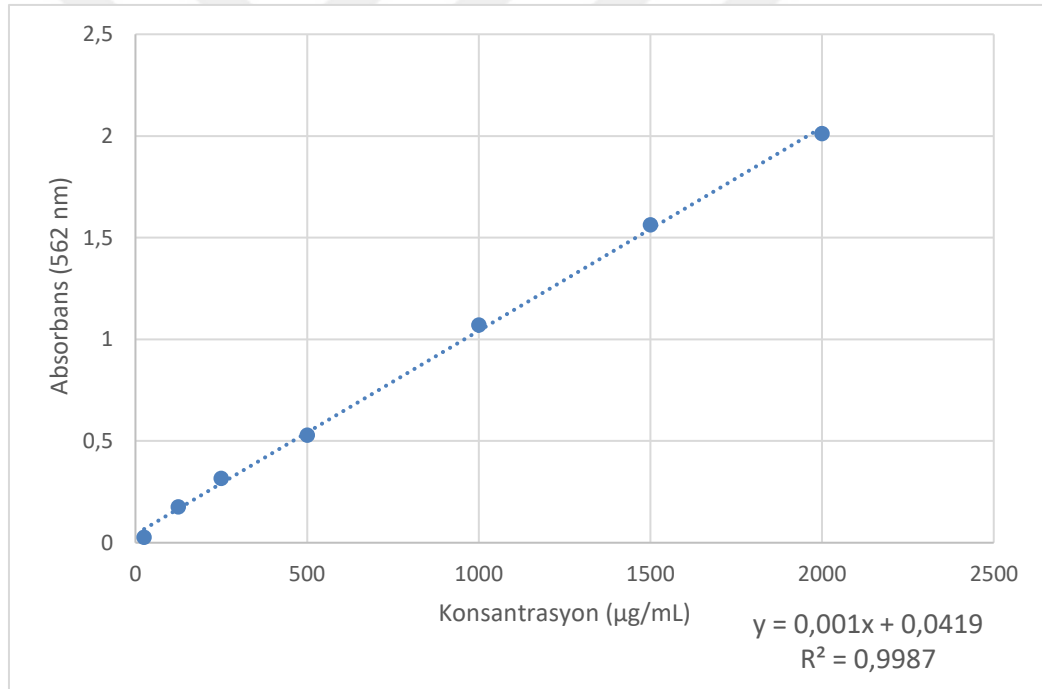
LC/MS-MS sonucunda protein ID numaralarıyla gelen sonuçlar UniProt ve PANTHER programları kullanılarak analiz edildi. UniProtta proteinlerin isimleri ve fonksiyonları araştırılırken, PANTHER programı kullanılarak metabolik fonksiyonları ve proteinlerin bulunduğu hücresel komponentler analiz edildi.

4. BULGULAR

4.1.PROTEİN ANALİZ SONUÇLARI

4.1.1. Protein Konsantrasyonları

48 saat ve 72 saat ko-kültüre bırakılmış örneklerden “Bölüm 3.3”de anlatıldığı şekilde metanol-kloroform-su yöntemiyle protein eldesi gerçekleştirildi. Protein eldesi sonrasında “Smart™ BCA Protein Assay Kit” kullanılarak protein konsantrasyonları hesaplandı. Kit içeriğinde bulunan BSA stoğundan 25, 125, 250, 500,1000,1500 ve 2000 µg/mL konsantrasyonlara sahip standartlar hazırlandı, standartların ve örneklerin 562nm’de maksimum absorbens değerleri hesaplanarak standart grafiği elde edildi.



Şekil 4.1: BSA standartları ile çizilen standart grafiği (R²= 0.9987).

Şekil 4.1’de gösterilen lineer grafik ve doğru denklemi kullanılarak izolasyonu yapılmış olan protein örneklerinin konsantrasyonları hesaplandı. Her bir örnek için hesaplanan protein konsantrasyonu Tablo 4.1’de gösterilmiştir.

Tablo 4. 1: Her bir örnek için hesaplanan protein konsantrasyonları.

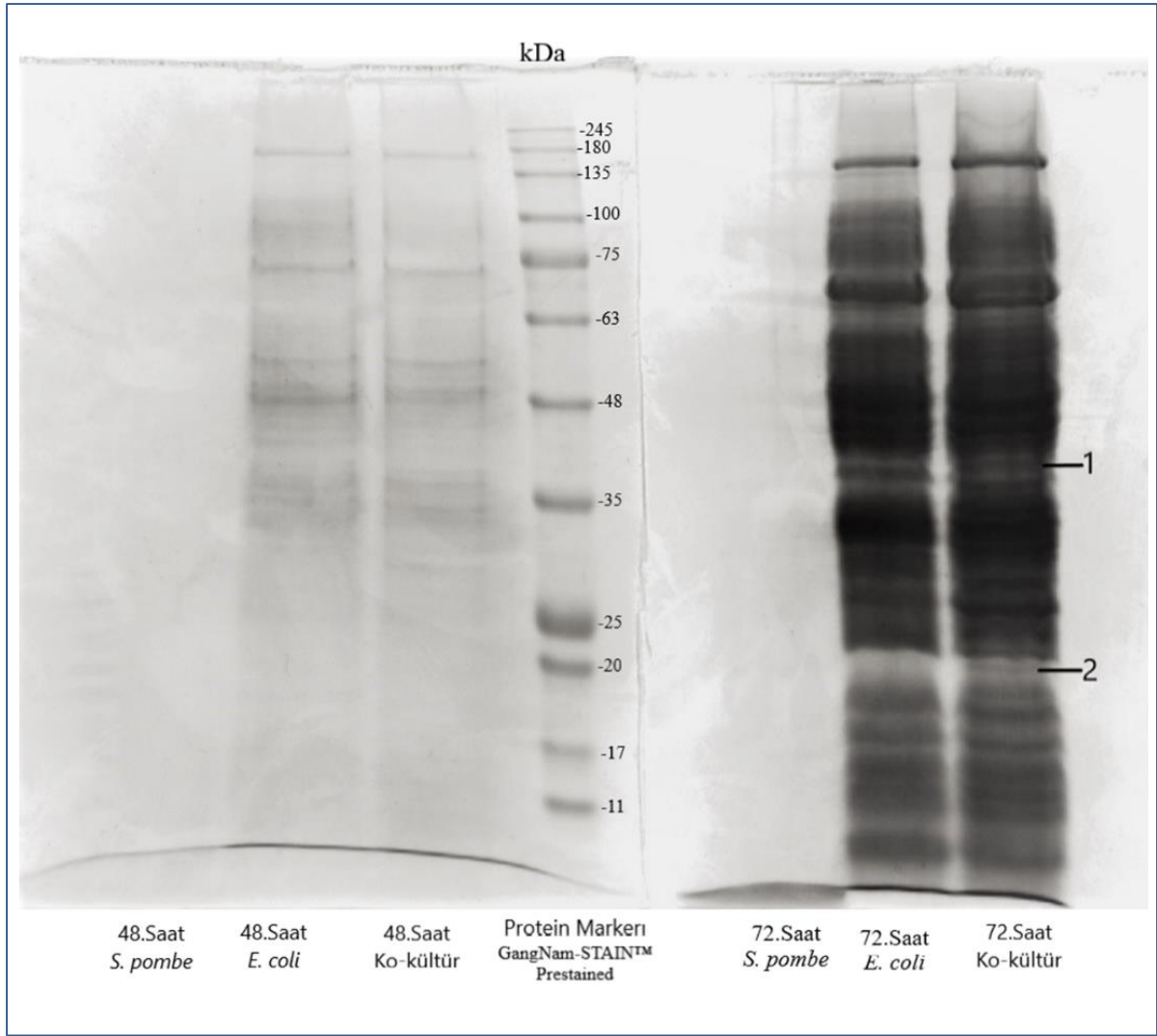
Deney Seti	Protein Konsantrasyonu (µg/mL)
<i>S. pombe</i> kültürü (48. saat)	0
<i>E. coli</i> kültürü (48. saat)	591
Ko-kültür (48. saat)	746
<i>S. pombe</i> kültürü (72. saat)	261
<i>E. coli</i> kültürü (72. saat)	4521
Ko-kültür (72. saat)	4781

Jele yükleme yapmadan önce her kuyuya aynı konsantrasyonda örnek yüklemek için 48 saat ve 72 saat örnekleri kendi aralarında hesaplandı. 48.saatte izolasyonu gerçekleşmiş olan örnekler için her bir örneğin protein konsantrasyonu 15 µg, 72.saatte izolasyonu gerçekleşmiş olan örnekler için her bir örneğin protein konsantrasyonu 90,4 µg olacak şekilde poliakrilamid jel elektroforezi gerçekleştirildi. 48. Saat *S. pombe* kültürü standart grafiğin dışında kaldığı için hesaplamalara dahil edilmedi.

4.1.2. Elektroforetik Analiz Sonuçları

Protein konsantrasyonları hesaplanan protein örnekleri, 1:1 (v:v) oranında örnek yükleme tamponu ile karıştırıldı. 48. saate ait üç örnek her birinin konsantrasyonu 15 µg, 72. saate ait üç örnek her birinin konsantrasyonu 90,4 µg olacak şekilde jel kuyularına yüklendi.

200 V sabit voltajda yürütülen proteinler daha sonrasında Coomassie boyama yöntemi ile görünür hale getirildi. Boyama sonucunda jel üzerinde gözle görünür hale gelen bantlar ChemiDoc MP (Bio-Rad) sistemi ve ImageLab 5.2.1 yazılımı kullanılarak analiz edildi (Şekil 4.2).



Şekil 4.2: Coommasie boyama sonrasında görünür hale gelen protein bantları.

Şekil 4.2’de verilmiş olan görüntüde 1., 2. Ve 3. kuyular 48. saatte izole edilmiş örnekleri yansıtırken; 5., 6. ve 7. kuyulara yüklenmiş örnekler 72. saatte izole edilen örnekleri göstermektedir. 4. Kuyuya GangNam-STAIN™ Prestained Protein Markerı (İntron Biotechnology, 24052) yüklenmiştir. Görüntülemeye, jele 15 µg yüklenmiş olan 48. saat örneklerinin protein bantları, jele 90,4 µg yüklenmiş olan 72. Saat örneklerinin bantlarından silik olduğu gözlemlenmiştir. Jel dikkatle incelendiğinde ise Şekil 4.1’de işaretlenmiş olan 1 ve 2 numaralı bantların 72. saat kontrol gruplarından kalitatif olarak farklılık arz ettiği tespit edilmiştir. Bu sebeple bu bantlar steril bir öze ile kesilmiş ve dH₂O içerisinde temiz bir mikrosantrifüj tüpüne alınarak LC-MS/MS analizi için hazırlanmıştır.

4.1.3. LC-MS/MS Sonuçları

LC-MS/MS protein sonuçları UniProt'ta analiz edilmiş ve protein isimleri ve fonksiyonlarıyla Tablo 4.2'de verilmiştir. Ayrıca proteinler çevrimiçi bir platform olan PANTHER programı kullanılarak, tanımlanan proteinlerin ve hücresel yerleşimine göre (Şekil 4.3) ve hücresel işlevlerine göre (Şekil 4.4) sınıflandırılmıştır.

Tablo 4.2 : LC-MS/MS Sonuçları.

UniProt Protein Numarası	Protein İsmi	Fonksiyonu
P0A955	KHG/KDPG aldolaz	Entner-Doudoroff yolağında glikozun parçalanması sürecinde rol oynar.
A1AGT8	Fe/S biyogenez proteini NfuA	Demir-kükürt kümesi biyogenezinde yer alır. Ayrıca demir-kükürt içeren hasarlı proteinler için şaperon görevi görebilir.
P77258	N-etilmaleimid redüktaz	Toksik bileşiklerin parçalanmasında yer alır. N-etilmaleimid molekülünün N-etilsüksinimid molekülüne indirgenmesini katalize eder.
A1AHF3	L-treonin 3-dehidrojenaz	L-treonin aminoasidini 2-amino-3-ketobütirat molekülüne okside eder.
P00935	Sistatyonin gama sentaz	L-sisteinden L-sistatyonin oluşumunu katalize eder.
P0A9T4	Protein tas	Tas, aldo-keto redüktazlara benzerliği olan bir proteindir. Fizyolojik substrat bilinmemektedir. Amino asit açlığına hücresel tepkide yer almaktadır.
A1AGC4	50S ribozomal protein L13	50S alt birimi oluşturan ilk proteinlerdendir.

Tablo 4.2 (devam) : LC-MS/MS Sonuçları.

A1A8A5	Trigger faktör	Protein taşınmasında görev alır. Yeni sentezlenmiş bir proteini üçüncül yapısını almadan önce açık konformasyonunda koruyarak bir şaperon görevi görür.
P0A917	Dış membran proteini X OmpX	<i>E. coli</i> 'ye ait yüksek korunmuşlukta küçük (18 kDa) bir dış zar proteinidir. Bakteriyel yapışmayı ve memeli hücrelerine girişi kolaylaştırır. Ayrıca, insan kompleman sistemi tarafından gelen saldırılara karşı direnç geliştirmede rol oynar.
P0AGE6	Kinon redüktaz	Kinonların indirgenmesini kataliz eder. Yüksek oranda reaktif semikinon ara ürünlerinin oluşumunu önler ve hidrojen peroksit toleransını destekleyen kinoller üretir. Ayrıca toksik kromatı daha az toksik olan Cr3+'a indirgeyebilir.
P0A9S5	Gliserol dehidrogenaz	Gliserolün dihidroksiasetona oksidasyonunu kataliz eder. Mikroorganizmaların anaerobik koşullar altında bir karbon kaynağı olarak gliserol kullanmasını sağlar.
P0AB73	Fruktoz-bifosfat aldolaz sınıf 2	Glukoneogenezde fruktoz 1,6-bifosfat (FBP) oluşturmak için dihidroksiaseton fosfatın (DHAP veya gliseron-fosfat) gliseraldehit 3-fosfat (G3P) ile aldol yoğunlaşmasını ve glikolizde ters reaksiyonu katalize eder.

Tablo 4.2 (devam) : LC-MS/MS Sonuçları

P0AEE5	D-galaktoz bağlayıcı periplazmik protein	Bu protein, galaktoz ve glikozun aktif taşınmasında rol oynar. Trg kemoreseptörü ile etkileşerek iki şekere karşı kemotaksiste rol oynar.
A8A810	Ornitin karbamoiltransferaz	L-sitrülin üretmek için karbamoil grubunun karbamoil fosfattan (CP) ornitinin (ORN) N(epsilon) atomuna transferini tersine çevirerek katalize eder.
B1X9H2	N-metil-L-triptofan oksidaz	N-metil-L-triptofanın oksidatif demetilasyonunu katalize eder.
B7NIC7	2,3,4,5-tetrahidropiridin-2,6-dikarboksilat N-suksiniltransferaz	(S)-tetrahidrodipikolinattan (süksinilaz yolu) LL-2,6-diaminopimelat sentezleyen alt yolun 1. adımında yer alır.
P31133	Putresin bağlayıcı periplazmik protein PotF	Putresin alımına dahil olan ABC taşıyıcı kompleksi PotFGHI'nin bir parçasıdır. Putresin'i bağlar. Glukoz varlığında hücre büyümesi için gerekli olan optimum poliamin konsantrasyonunun korunması için putresin ithal eder.
P76108	Bifonksiyonel polihidroksibütirat sentaz / ABC taşıyıcı periplazmik bağlayıcı protein	R-3-hidroksibutiratın (cPHB) kısa polimerlerinin oluşumunu katalize eder. ABC taşıyıcı kompleksi YdcSTUV'nin bir parçasıdır. Transformasyon sırasında dsDNA'yı bağlayabilir ve YdcV'nin oluşturduğu iç zar kanalına iletebilir (Olası).

Tablo 4.2 (devam) : LC-MS/MS Sonuçları.

A8A1P5	Histidinol-fosfat aminotransferaz	Bu protein, 5-fosfo-alfa-D-riboz 1-difosfattan L-histidin sentez yolağının 7. adımında yer alır, katalitik aktivite gösterir.
A1AG76	Argininosüksinat sentaz	Bu protein, L-ornitin ve karbamoil fosfattan L-arginini sentez yolağının 2. adımında yer alır.
P0AGE9	Süksinat--CoA ligaz alt birim alfa	Süksinil-CoA sentetaz, sitrik asit döngüsünde (TCA) işlev görür, süksinil-CoA'nın hidrolizini ATP veya GTP sentezine bağlar ve bu nedenle TCA'da substrat düzeyinde fosforilasyonun tek adımını temsil eder.
P0A7A9	İnorganik pirofosfataz	İnorganik pirofosfatın (PPi) hidrolizini katalize eder.
P0AE11	Alkil hidroperoksit redüktaz C	Hidrojen peroksit ve organik hidroperoksitlerin sırasıyla suya ve alkollere indirgenmesini katalize eden tiyol spesifik peroksidazdır. Peroksitleri detoksifiye ederek oksidatif strese karşı hücre korumasında rol oynar.
P27250	Aldehit redüktaz Ahr	Alifatik yağlı aldehitler (C4-C16) dahil olmak üzere çok çeşitli aldehitlerin karşılık gelen alkollerine indirgenmesini katalize eder. <i>E. coli</i> 'de NADPH'ye bağlı aldehit redüktaz aktivitesinin ilgili bir kaynağıdır. Ahr'ın in vivo fonksiyonları henüz belirlenmemiştir.

Tablo 4.2 (devam) : LC-MS/MS Sonuçları.

A7ZHR2	Ribozom geri dönüşüm faktörü	Protein biyosentezinin sonunda mRNA'dan ribozomların salınmasından sorumludur.
A1AGK2	30S ribozomal protein S3	30S alt biriminin alt kısmını bağlar. 70S ribozomunda mRNA'yı bağlar ve onu translasyon için konumlandırır.
P0AEK4	Enoil-[açıl-taşıyıcı-protein] redüktaz [NADH] FabI	Bir açıl-taşıyıcı proteine (ACP) kovalent olarak bağlı enoil kısmındaki karbon-karbon çift bağının indirgenmesini katalize eder. Lipid metabolizmasında ve biyotin biyosentezinde kullanılan yağ asitlerinin uzama döngüsünde yer alır.
A7ZUJ7	50S ribozomal protein L1	Doğrudan 23S rRNA'ya bağlanır. L1 bölgesi ribozomda oldukça hareketlidir ve E bölgesi tRNA salınımında rol oynar. Protein L1 aynı zamanda bir translasyon baskılayıcı proteindir, mRNA'ya bağlanarak L11 operonunun translasyonunu kontrol eder.
P0A910	Dış membran protein A OmpA	Periplazmadaki peptidoglikan hücre duvarının konumunun korunmasında rol oynadığı düşünülmektedir. Çevresel strese karşı dirençte, dış zarın işlevselliğinde ve hücre şeklinde rol oynar.
P0ABC7	FtsH proteaz HflK modülatörü	Isıya cevaben sentezlenen katalitik aktivitelerin negatif regülatör enzimidir.

Tablo 4.2 (devam) : LC-MS/MS Sonuçları.

P0ADS6	Karakterize edilmemiş protein YggE	DNA hasarı uyarısına hücrel yanıtta, ısıya hücrel tepkide ve reaktif oksijen türlerine hücrel tepkide rol oynadığı düşünülmektedir.
P29012	Alanin rasemaz, katabolik	L-alanin'i D-alanin'e izomerize eder ve daha sonra DadA tarafından pirüvata oksitlenir.
P0AG82	Fosfat bağlayıcı protein PstS	Fosfat alımına dahil olan ABC taşıyıcı kompleksi PstSACB'nin bir parçasıdır.
A1AGC9	Malat dehidrogenaz	Malat'ın oksaloasetata tersinir oksidasyonunu katalize eder.
P0A992	Fruktoz-bifosfat aldolaz sınıf 1	β -D-fruktoz 1,6-bisfosfat molekülünün, D-gliseraldehit 3-fosfat ve dihidroksiaseton fosfat moleküllerine yarılmasını katalizler.
A7ZR14	Aminometiltransferaz	Glisin parçalanmasını katalize eder.
A7ZV11	Ko-şaperonin GroES	Şaperonin GroEL'le birlikte, protein katlanmasına yardımcı olmada önemli bir rol oynar.
P0ACU7	HTH tipi transkripsiyonel düzenleyici YjdC	DNA bağlayıcı transkripsiyon faktörü aktivitesi gösterir.
P0A9A6	Hücre bölünme proteini FtsZ	GTPaz aktivitesiyle hücre bölünmesi, bölme septum montajı, protein polimerizasyonu, gibi pekçok hayati hücrel süreçte rol oynayabilir.

Tablo 4.2 (devam) : LC-MS/MS Sonuçları.

P0A862	Tiyol peroksidaz	Hidrojen peroksit ve organik hidroperoksitlerin sırasıyla suya ve alkollere indirgenmesini katalize eden tiyol spesifik peroksidaz, peroksitleri detoksifiye ederek oksidatif strese karşı hücre korumasında rol oynar. Alkil hidroperoksitleri tercih eder ve bakteriyel membran oksidasyonunu inhibe etmek için lipid peroksidaz görevi görür. Anaerobik büyüme sırasında ana antioksidan görevi görür.
A1AJ55	Elongasyon factorü P	Peptit bağı sentezinde yer alır. Translasyonun uzama evresinde etkindir.
P46009	Dış membran öncü protein FocD	F1C fimbria alt birimlerinin dış membran boyunca dışa salımında rol oynar.
A1AGJ1	50S ribozomal protein L15	23S rRNA'ya bağlanır.
P11446	N-asetil-gama-glutamil-fosfat redüktaz	N-asetil-5-glutamil fosfatın NADPH'ye bağlı indirgenmesini katalize ederek N-asetil-L-glutamat 5-semialdehit verir.
P31697	Şaperon proteini FimC	Tip 1 fimbriaların biyogenezi için gereklidir. FimH'ye bağlanır ve etkileşime girer.
P0A953	3-oksoasil-[asil-taşıyıcı-protein] sentaz 1	Tip II yağ asidi uzama döngüsünde yer alır. Malonil-ACP'den bir açıl akseptörüne iki karbonun eklenmesiyle çok çeşitli açıl-ACP'nin uzamasını katalize eder.

Tablo 4.2 (devam) : LC-MS/MS Sonuçları.

P0ACU7	HTH tipi transkripsiyonel düzenleyici YjdC	DNA bağlayıcı transkripsiyon faktörü aktivitesi gösterir.
A7ZTU6	ATP sentaz alt birimi alfa	Membran boyunca bir proton gradyanı varlığında ADP'den ATP üretir. Alfa zinciri düzenleyici bir alt birimdir.
P69811	Multifosforil transfer proteini	Başlıca bir karbonhidrat aktif taşıma sistemi olan fosfoenolpiruvat bağımlı şeker fosfotransferaz sistemi (şeker PTS), hücre zarı boyunca yer değiştirmeleriyle birlikte gelen şeker substratlarının fosforilasyonunu katalize eder.
Q46851	L-gliseraldehit 3-fosfat redüktaz	L-gliseraldehit 3-fosfatın (L-GAP) stereospesifik, NADPH'ye bağlı indirgenmesini katalize eder.
A1A9L5	Dihidroorotat dehidrojenaz (kinon)	Elektron alıcısı olarak kinon ile dihidroorotatın orotata dönüşümünü katalize eder.
P27828	UDP-N-asetilglukozamin 2-epimeraz	UDP-N-asetilglukozaminin (UDP-GlcNAc) C-2'deki tersine çevrilebilir epimerizasyonunu katalize eder ve böylece bakterilere ManNAc kalıntılarının aktive edilmiş donörü olan UDP-N-asetilmannosamin (UDP-ManNAc) sağlar.
B7LQ20	Gliseraldehit-3-fosfat dehidrojenaz	Kofaktör NAD kullanarak gliseraldehit 3-fosfatın (G3P) 1,3-bifosfogliserata (BPG) oksidatif fosforilasyonunu katalize eder.

Tablo 4.2 (devam) : LC-MS/MS Sonuçları.

A1AE82	Serin hidroksimetiltransferaz	Tetrahidrofolat (THF) ile serin ve glisinin tersinir reaksiyonunu katalize eder.
P69783	PTS sistemi glikoza özgü EIIA bileşeni	Başlıca bir karbonhidrat aktif taşıma sistemi olan fosfoenolpiruvat bağımlı şeker fosfotransferaz sistemi (şeker PTS), hücre zarı boyunca yer değiştirmeleriyle birlikte gelen şeker substratlarının fosforilasyonunu katalize eder.
P02925	Riboz salınımı bağlayıcı protein RbsB	ABC-taşıyıcı kompleksinin bir üyesidir, riboz şekerinin hücre dışına taşınımında rol oynar. Ayrıca kemotaksi için birincil kemoreseptör görevi görür.
A7ZV33	Oligoribonükleaz	Oligoribonükleotitler için spesifik 3' ila 5' eksoribonükleaz aktivitesi gösterir.
P00448	Süperoksit dismutaz [Mn]	Hücrelerde üretilen ve biyolojik sistemler için toksik olan süperoksit anyon radikallerini yok eder.
P76015	PEP'e bağımlı dihidroksiaseton kinaz, dihidroksiaseton bağlayıcı alt birim DhaK	DhaL-ATP'den bir fosforil grubu transferi yoluyla dihidroksiasetonun fosfoenolpiruvata (PEP) bağımlı fosforilasyonundan sorumlu olan dihidroksiaseton kinazın dihidroksiaseton bağlayıcı alt birimidir.
E0J5J4	2-dehidro-3-deoksiglukonokinaz	2-keto-3-deoksi-6-fosoglukonat (KDPG) üretmek için 2-keto-3-deoksiglukonatın (KDG) fosforilasyonunu katalize eder.

Tablo 4.2 (devam) : LC-MS/MS Sonuçları.

P0AEP3	UTP--glukoz-1-fosfat uridililtransferaz	Durağan fazda hücrelerin hayatta kalmasında rol oynayabilir. Pek çok metabolik yolda rol oynayan (-UDP aktaran) transferaz fonksiyonlu bir enzimdir.
A1AE53	4-hidroksi-3-metilbut-2-en-1-il difosfat sentaz	2C-metil-D-eritritol 2,4-siklodifosfatı (ME-2,4cPP) 1-hidroksi-2-metil-2-(E)-butenil 4-difosfata dönüştürür.
P69908	Glutamat dekarboksilaz alfa	Reaksiyonda bir hücre içi proton tüketerek glutamati gama-aminobütirata (GABA) dönüştürür. Gad sistemi, hücreler aşırı asidik koşullara maruz kaldığında nötre yakın hücre içi pH'ın korunmasına yardımcı olur.
Q46856	Alkol dehidrojenaz YqhD	NADP'ye bağlı ADH aktivitesi gösterir.
A1A7L3	30S ribozomal protein S2	Ribozomu yapısal bileşenidir.
P00946	Mannoz-6-fosfat izomeraz	Glikozun GDP-L-fukoza dönüştürülmesinde yer alır.
P0AFH8	Ozmotik olarak indüklenebilir protein Y	Şaperon aracılı protein katlanmasında, hiperozmotik yanıtta ve ozmotik strese karşı yanıtta rol oynar.
P0A9H7	Siklopropan-yağ-açıl-fosfolipid sentaz	S-adenosil-L-metioninden bir metilen grubunu doymamış bir yağ asidi zincirinin cis çift bağına aktarır ve çift bağın bir metilen köprüsü ile değiştirilmesinde rol oynar.

Tablo 4.2 (devam) : LC-MS/MS Sonuçları.

A1A7K0	Glutamat-1-semialdehit 2,1-aminomutaz	(S)-4-amino-5-okso-pentanoat'tan 5-aminolevulina oluşumunu katalize eder.
A1A8A6	ATP'ye bağımlı Clp proteaz proteolitik alt birimi	ATP hidrolizi gerektiren bir süreçte çeşitli proteinlerdeki peptitleri parçalar.
P21367	Olası hidrolaz YcaC	Hidrolaz aktivitesi gösterdiği düşünülmektedir.
P0A867	Transaldolaz A	Transaldolaz, pentoz-fosfat yolundaki metabolitlerin dengesi için önemli bir proteindir.
P39377	İzoaspartil dipeptidaz	L-izoaspartil (L-beta-aspartil) dipeptitlerinin bir alt kümesinin hidrolitik bölünmesini katalize eder. L-izoaspartil kalıntıları oluşumundan zarar görmüş proteinleri parçalamak için kullanılır.
Q0TCF3	50S ribozomal protein L5	Ribozomal alt birimlerin hareketinde rol oynayan yapıyı oluşturur. Ribozomdaki P bölgesi tRNA ile bağlantı kurar; 5S rRNA ve ilişkili proteinlerinden bazıları, ribozoma bağlı tRNA'ların konumlanmasını stabilize etmeye yardımcı olabilir.
A1AGJ4	50S ribozomal protein L6	Bu protein 23S rRNA'ya bağlanır ve ikincil yapısında önemlidir.
P0A871	Transaldolaz B	Transaldolaz, pentoz-fosfat yolundaki metabolitlerin dengesi için önemlidir.

Tablo 4.2 (devam) : LC-MS/MS Sonuçları.

P00509	Aspartat aminotransferaz	2-oxoglutarate ve L-aspartate'dan, L-glutamate ve oxaloacetate oluşumunu katalize eder.
B7NLP6	30S ribozomal protein S7	Birincil rRNA bağlayıcı proteinlerden biri, doğrudan 16S rRNA'ya bağlanır ve burada 30S alt biriminin baş bölgesinin birleşimini çekirdeklendirir.
P0A7Z4	DNA'ya yönelik RNA polimeraz alt birimi alfa	DNA'ya bağımlı RNA polimeraz (RNAP), substrat olarak dört ribonükleosit trifosfat kullanarak DNA'nın RNA'ya transkripsiyonunu katalize eder.
A1AGI7	30S ribozomal protein S4	Birincil rRNA bağlayıcı proteinlerden biridir, doğrudan 16S rRNA'ya bağlanır ve burada 30S alt biriminin gövdesinin birleşimini çekirdeklendirir.
P0AGD3	Süperoksit dismutaz [Fe]	Hücrelerde üretilen ve biyolojik sistemler için toksik olan süperoksit anyon radikallerini yok eder.
P08506	D-alanil-D-alanin karboksipeptidaz DacC	Şeker-peptid hücre duvarı öncülerinden C-terminal D-alanil kalıntılarını giderir.
A7ZJA8	Süksinat-CoA ligaz [ADP oluşturan] alt birim beta	Süksinil-CoA sentetaz, sitrik asit döngüsünde (TCA) işlev görür, süksinil-CoA'nın hidrolizini ATP veya GTP sentezine bağlar ve bu nedenle TCA'da substrat düzeyinde fosforilasyonun tek adımını temsil eder.

Tablo 4.2 (devam) : LC-MS/MS Sonuçları.

B7LCN9	Fosforibosilformilglisinamidin siklo-ligaz	2-formamido-N1-(5-0-fosfo-β-D-ribosil)asetamidin + ATP = 5-amino-1-(5-fosfo-β-D-ribosil)imidazol + ADP + H ⁺ + fosfat reaksiyonunu katalize eder.
A8A3X7	4-deoksi-L-threo-5-heksosuloz-uronat ketol-izomeraz	5-dehidro-4-deoksi-D-glukuronatın 3-deoksi-D-gliser-2,5-heksodiülonata izomerizasyonunu katalize eder.
P0AEB2	D-alanil-D-alanin karboksipeptidaz DacA	Şeker-peptid hücre duvarı öncülerinden C-terminal D-alanil kalıntılarını giderir.
P0A9C3	Aldoz 1-epimeraz	Mutarotaz, alfa-aldozu beta-anomere dönüştürür. D-glukoz, L-arabinoz, D-ksiloz, D-galaktoz, maltoz ve laktoz üzerinde aktiftir.
P02931	Dış membran porin F	Küçük moleküllerin dış zar boyunca pasif difüzyonuna izin veren gözenekler oluşturur.
P0A9K3	PhoH benzeri protein	Sitoplazmik bir proteindir ve fosfat açlığı sırasında indüklendiği düşünülen bir ATPaz'dır.
A1AEW7	Enolaz	2-fosfogliseratın fosfoenolpiruvata tersinir dönüşümünü katalize eder. Karbonhidratların glikoliz yoluyla parçalanması için gereklidir.
A7ZMI2	Fenilalanin-tRNA ligaz alfa alt birimi	Fenilalanil-tRNA aminoasilasyonunundan sorumludur.
A7ZHR0	Elangasyon faktörü Ts	GDP'nin GTP'ye dönüşümünü teşvik eder.

Tablo 4.2 (devam) : LC-MS/MS Sonuçları.

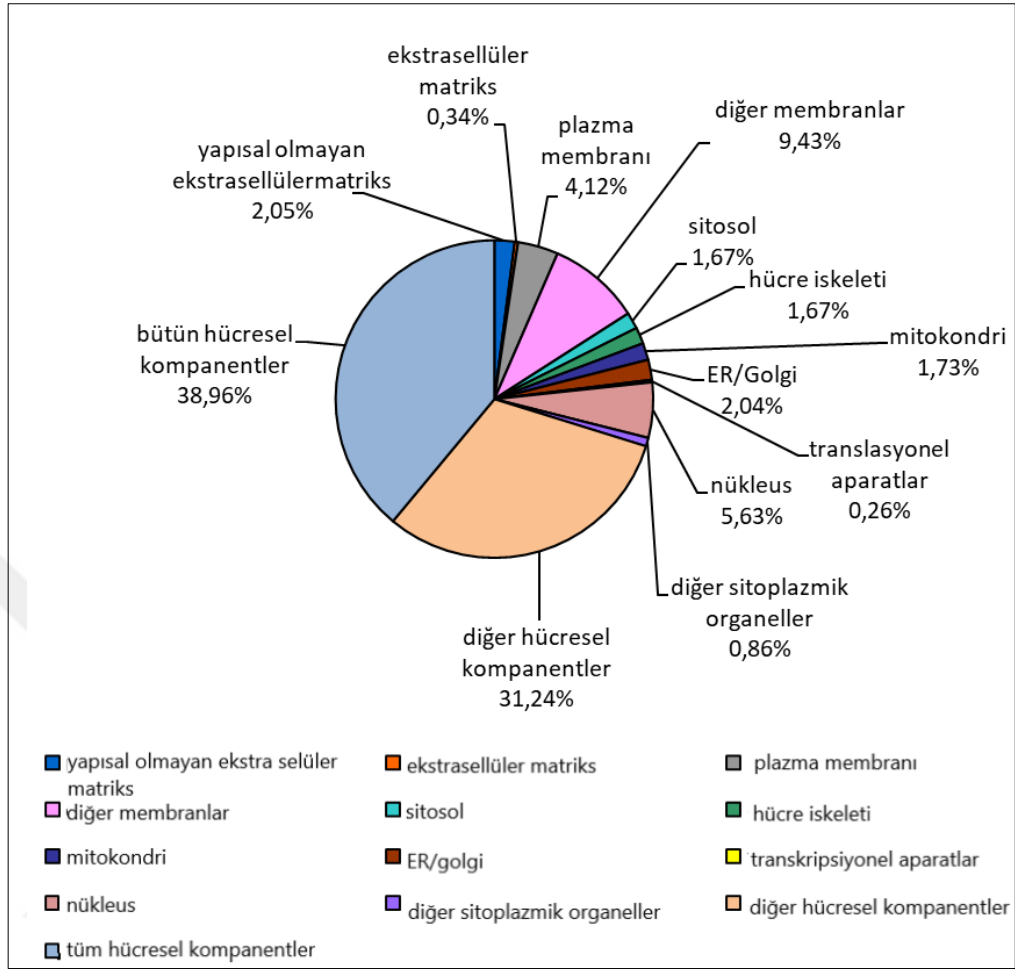
B1X931	Eritronat-4-fosfat dehidrojenaz	Eritronat-4-fosfatın 3-hidroksi-2-okso-4-fosfonooksibutanoata oksidasyonunu katalize eder.
P0AB77	2-amino-3-ketobütirat koenzim A ligaz	2-amino-3-ketobütirattan, glisin ve asetil-CoA oluşumunu katalize eder.
B5Z0M1	Fosfoheptoz izomeraz	D-glisero-D-manno-heptoz 7-fosfatta sedoheptuloz 7-fosfatın izomerizasyonunu katalize eder.
P0AEX9	Maltoz/maltodekstrin bağlayıcı periplazmik protein	Maltoz/maltodekstrin alımına dahil olan ABC taşıyıcı kompleksi MalEFGK'nin bir parçasıdır. Maltozu ve maltotrioz gibi daha yüksek maltodekstrinleri bağlar.
A7ZJM7	Açlık sırasında DNA koruması proteini	Hücre içi Fe^{+2} iyonunu sekestre ederek ve indirgendikten sonra salınabilen Fe^{+3} oksihidroksit minerali şeklinde depolayarak DNA'yı oksidatif hasardan korur.
A1AGK6	50S ribozomal protein L4	Birincil rRNA bağlayıcı proteinlerden biri olan bu protein, başlangıçta 23S rRNA'nın 5'-ucuna bağlanır.
P37747	UDP-galaktopiranoz mutaz	Üridin difosfogalaktopiranozun (UDP-GalP) 2-keto ara ürünü aracılığıyla üridin difosfogalaktofuranoza (UDP-GalF) karşılıklı dönüşümü katalize eder.
P0A9X4	Hücre şeklini belirleyen protein MreB	Hücre şeklinin belirlenmesi için gerekli olan zarla ilişkili dinamik filamentler oluşturur.

Tablo 4.2 (devam) : LC-MS/MS Sonuçları.

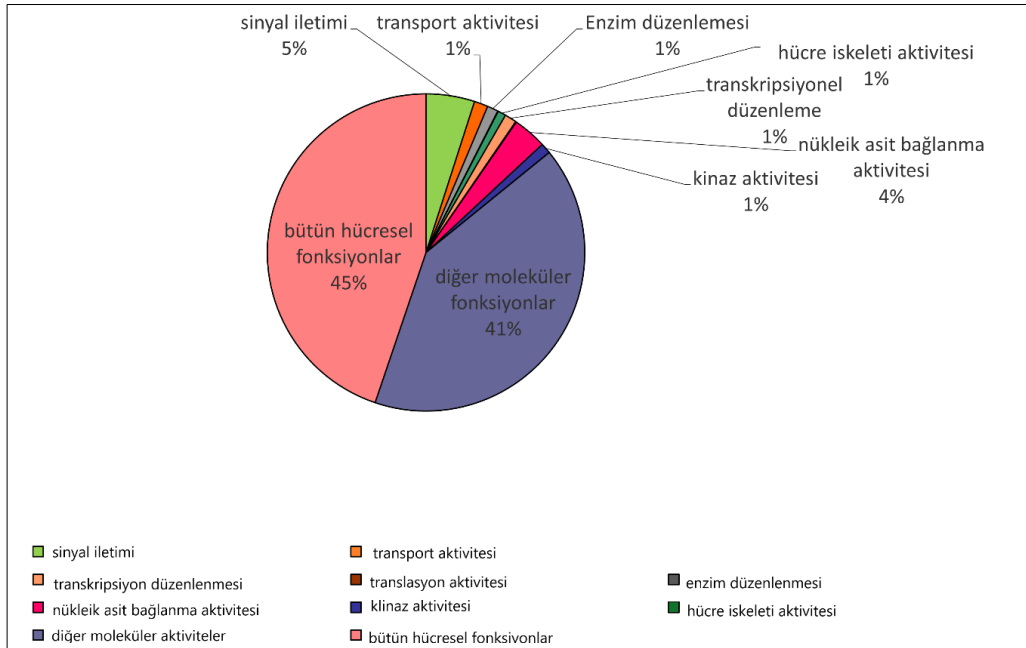
P04693	Aromatik-amino asit aminotransferaz	2-ketoizokaproat, p-hidroksifenilpiruvat ve fenilpiruvatın transaminasyonunu katalize ederek sırasıyla lösin, tirozin ve fenilalanin oluşturan enzimdir.
P0AEX9	Maltoz/maltodekstrin bağlayıcı periplazmik protein	Maltoz/maltodekstrin alımına dahil olan ABC taşıyıcı kompleksi MalEFGK'nin bir parçasıdır. Maltozu ve maltotrioz gibi daha yüksek maltodekstrinleri bağlar.
B7NDT8	50S ribozomal protein L2	Birincil rRNA bağlayıcı proteinlerden biri. tRNA bağlanması ve peptit bağı oluşumu için 70S ribozomunu oluşturmak üzere 30S ve 50S alt birimlerinin birleşmesi için gereklidir.
B1X797	6-fosfoglukonolaktonaz	6-fosfoglukonolaktonun 6-fosfoglukonata hidrolizini katalize eder.
A7ZJZ6	Fosfoserin aminotransferaz	3-fosfohidroksipiruvatın fosfoserine ve 3-hidroksi-2-okso-4-fosfonooksibutanoatın fosfohidroksitreonine tersinir dönüşümünü katalize eder.
P0A6N3	Elongasyon faktörü Tu	Bu protein, protein biyosentezi sırasında aminoasil-tRNA'nın ribozomların A bölgesine GTP'ye bağlı bağlanmasını destekler. Hücre büyümesinde ve besin yoksunluğuna bakteriyel yanıtta önemli bir düzenleyici rol oynayabilir.

Tablo 4.2 (devam) : LC-MS/MS Sonuçları.

B1IT77	Fosfoglisarat kinaz	Glikolitik yolda fosfoglisarolü fosfatlar.
P09394	Gliserofosfodiester fosfodiesteraz, periplazmik	Gliserofosforil diester fosfodiesteraz, deasile edilmiş fosfolipitleri G3P'ye ve ilgili alkollere hidrolize eder.
P31697	Şaperon proteini FimC	Tip 1 fimbriaların biyogenezi için gereklidir. FimH'ye bağlanır ve etkileşime girer.
P0ABK5	Sistein sentaz A	Sistein sentezindeki rol oynar. Ayrıca CdiA proteininin tRNAz aktivitesini uyarır. CdiA, hücrel temasla bağlı büyüme inhibisyonu (CDI) sistemi olarak işlev gören bir toksin-bağışıklık proteininin bileşenidir. CDI bileşenleri, bakterilerin temasla bağlı bir şekilde yakın ilişkili komşu bakterilerle iletişim kurmasına ve bu bakterilerin büyümesini engellemesine izin verir.
P0A9Q9	Aspartat-semialdehit dehidrojenaz	L-aspartil-4-fosfatın indirgeyici defosforilasyonu ile NADPH'ye bağlı L-aspartat-semialdehit (L-ASA) oluşumunu katalize eder.
P06996	Dış membran proteini C OmpC	Küçük moleküllerin dış zar boyunca pasif difüzyonuna izin veren gözenekler oluşturur, toksin reseptörüdür.
A1A9V7	Dihidroorotaz	Karbamoil aspartatın dihidroorotata dönüşebilir siklizasyonunu katalize eder.



Şekil 4.4 : Tanımlanan proteinlerin hücresel yerleşimine göre sınıflandırılması.



Şekil 4.3 : Tanımlanan proteinlerin hücresel yerleşimine göre sınıflandırılması.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Çoğu mikroorganizma doğal ortamlarında sürekli bir rekabet içinde yaşar. Mikroorganizmaların bulunduğu alanlardaki yoğunluğu ve çoğu ortamdaki kaynakların kıtlığı göz önüne alındığında, bir hücrenin hayatta kalması bir başka hücre için açlık anlamına gelebilir. Rekabet; rakip organizmanın doğrudan antibiyotik gibi moleküllerle öldürülmesi ya da mikroorganizmanın evrimsel süreçte edinilmiş olan seçici avantajlarından yararlanması gibi çok yönlü olabilir (Hibbing ve diğ., 2010). Çoğu ekosistemde sınırlayıcı faktör, karbon ve enerji kaynaklarıdır ve doğal yaşam alanlarında bakteriler besinle sınırlı koşullar altında düşük oranlarda büyümeye devam ederler. Hücrelerin karbon kaynağı sınırlı olan koşullara küresel tepkisi ile ilgili çalışmalar, bir dizi farklı fizyolojik fenomeni ortaya çıkarmıştır. Bununla birlikte, burada yer alan moleküler mekanizmalar yeterince aydınlatılamamıştır (Wick ve diğ., 2001). Bu çalışmada, karbon kaynağının sınırlandırılması koşullarında *E. coli* ve *S. pombe* organizmalarının birbirine karşı ya da tür içinde gösterdikleri etkileşimler araştırılmıştır. Yapılan analizler sonucunda çeşitli hücresel yerleşimlerde bulunan (Şekil 4.3) ve çeşitli hücresel süreçlerde yer alan (Şekil 4.4) proteinler saptanmıştır.

Ortamdaki glikoz miktarının azalması ya da rakip organizmaların glikozu kullanması durumunda glikoz transportunda yer alan MglB gibi glikoz bağlayıcı proteinlerin artışı gerçekleşir (Notley-McRobb ve Ferenci, 1999). Bu durum ortamdaki az miktarda bulunan glikozun eldesi için başka türler ile girilen rekabettin bir parçası olarak değerlendirilebilir.

E. coli hücrelerinde bulunan maltoz/maltodekstrin bağlayıcı periplazmik protein (malE) ve D-galaktoz bağlayıcı periplazmik protein (mglB), LC-MS-MS sonuçlarında karşımıza çıkan bağlayıcı proteinlerdendir. Bağlayıcı protein MglB, glikoz için yüksek bir afiniteye sahiptir (Ferenci, 1996), ve düşük glikoz konsantrasyonunda, glikoz hücreler tarafından esas olarak bu yolla alınır. Egli ve diğerleri (1993)'nin yaptıkları bir çalışmada, düşük glikoz içeren *E. coli* kültürüne 1.8 mg l-1 galaktoz vermeleri, hücrelerin glikoz kullanımını azaltmış ve sürekli kültürde glikoz birikimine yol açmıştır. Ayrıca Hua ve diğ., (2004) yaptıkları çalışmada çeşitli karbon kaynakları için sınırlı kemostat kültürlerinde membran taşıyıcı proteinleri kodlayan bir dizi genin ekspresyonun önemli ölçüde indüklendiğini ve bu genlerin yaklaşık yarısının maltoz (malGFE ve malK-lamB-malM operonlarının tüm genleri), galaktoz (mglBAC operonunun üç geni) alımını kolaylaştıran çok çeşitli yüksek afiniteli ABC taşıma sistemlerinde yer alan genler

olduğunu göstermişlerdir. *E. coli*'de ABC taşıyıcı gen ailesi tüm genomun yaklaşık %5'ini kaplamaktadır (Linton ve Higgins, 1998). Bu da bu genlerin ne kadar önemli olduğunu göstermektedir. Çevresel koşullar altında bakteri üreme ve davranışının araştırılması için karbon sınırlı kültürler önerilmiştir (Matin, 1979; Moriarty, 1993; Morita, 1993). Bu nedenle, çalışmamızda gerçekleştirilen proteom analizi sonucunda %0,1 glikoz içeren, karbon kaynağı sınırlandırılmış olan kültürlerde *mglB* ve *malE* proteinlerinin nitel artışı, *E. coli*'nin ko-kültür şartlarında kaynak için rekabet ettiğini düşündürmektedir.

Açlık sırasında DNA koruması proteini, *dps*, durağan faza geçiş anında *RpoS*- bağımlı durum neticesinde oluşarak DNA ile kompleks oluşturarak DNaz tarafından etkilenmesine karşı direnç kazandırmaktadır (Almiron ve diğ., 1992). Çalışmada kullanılan *E.coli* bakterilerinin durağan faza geçmeden ko-kültüre alınması ve 72. saatte elde edilen hücrelerden alınan proteinlerin analizi sonucunda, *dps* oluşması mevcut kalori kısıtlaması ile paralel sonuçlar vermektedir. Ayrıca *dps* proteini, oksidatif strese, demir ve bakır toksisitesine, ısı stresine ve asit baz şoklarına karşı da yanıtta görev almaktadır (Nair ve Finkel, 2004). Gliserol dehidrogenaz enzimi mikroorganizmaların anaerobik koşullar altında karbon kaynağı olarak gliserolün kullanılmasını mümkün kılmaktadır (Gonzalez ve diğ., 2008; Silva ve diğ., 2019). *SodA* oksidatif strese karşı yanıtta önemli bir birimdir (McCord, 1993) ve bu *Sod* enzimi Fe ve/veya Mn ile metalloprotein olarak işlev sergilemektedir (Edwards ve diğ., 1998). Kinon redüktaz toksik kromatı daha az toksik olan Cr^{+3} 'e indirgeyebilirken çok düşük miktarda ROS oluşturmaktadır (Ackerley ve diğ., 2004). Yalnız Gonzalez ve diğ.,'leri (2005) yaptığı çalışmada kinon redüktazın iki elektron transferi ile ROS'lara karşı toleranslı olabileceğini belirtmektedir. Ko-kültür ortamındayken *dps*, *sodA*[Mn], *gldA* proteinlerin varlıkları, *E.coli*'de açlık stresinin yanında oksidatif stresin de meydana geldiğini ve buna karşı yanıt mekanizmalarının etkinleştğini göstermektedir.

Çalışmada elde edilen bir diğer protein; karakterize edilmemiş protein *YggE*'dir. Yapılan çalışmalarda *ygge* geninin oksidatif stres altında yüksek ekspresyon sergileyen genlerden biri olduğu ve *ygge* gen ürünlerinin, bakteri hücrelerini koruma veya oksidatif stresten kaynaklanan hücresel hasarı iyileştirmede işlevsel olduğu düşünülmektedir (Levina ve diğ., 1999). Kim ve diğelerinin (2005) yaptıkları çalışmada; *ygge* gen ürününün hücre içi ROS'u orta derecede zararsız bir düzeye indirerek amino asit biyosentezleriyle ilgili genleri oksidatif hasardan koruduğunu düşünmektedir. Bu tez kapsamında yapılan ko-kültür koşullarının birçok noktadan

hücreleri strese maruz bıraktığı da göz önüne alındığında, (glikoz açlığı, başka türden bir organizmanın varlığı, hücrelerin 32° C’de üretilmesinin vermiş olabileceği ısı stresi vb.) yggE proteininin kontrol grubuna göre artış göstermiş olması, daha önceden yapılmış olan çalışmaları destekler niteliktedir.

Dış zar proteinleri (Omp), dış zarda sabitlenmiş, β -fiçı yapıları 8 ila 26 iplikle oluşturulmuş benzersiz bir integral membran proteinleri sınıfıdır. Hücre dışı tarafta iplikler arasında geniş, uzanan ilmekler ve periplazmik tarafta kısa ilmekler vardır. Bu özellikler sayesinde Omp’ler membranda yüksek kararlılık ve zorlu ortamlara karşı mücadele etme yeteneği sağlarlar (Rollauer ve diğ., 2015). Farklı Omp’ler farklı dizilere ve işlevlere sahip olsalar da yapısal ve biyolojik özellikler neticesinde benzerlik göstermektedir (Chaturvedi ve Mahalakshmi, 2017). OmpA ilk olarak 1974’te *E. coli*’de ısıyla değiştirilebilir bir protein olarak tanımlanmıştır (Foulds ve Chai, 1978) ve orijinal olarak 1977’de saflaştırılmıştır. Molekül kütlesi 28 kDa ila 36kDa arasında değişmektedir (Chai ve Fould, 1977). OmpA ailesi, gram negatif bakterilerin Omp’lerinde yüksek kopya sayısına sahip olan porin proteinlerinin bir grubudur. OmpA, bakteriyel yüzey bütünlüğünün korunmasında önemli bir rol oynar (Samsudin ve diğ., 2016). OmpX, konak savunma mekanizmalarını nötralize ederek virülans için önemli gibi görünen yüksek oranda korunmuş protein ailesine aittir (Heffernan ve diğ., 1994). 72 saatlik ko-kültür ortamında OmpA, OmpX, OmpC, OmpF, FocD, FimC proteinleri LC-MS-MS sonuçlarında karşımıza çıkan diğer proteinlerdir. Deconinck ve diğ., (2020) OmpA proteininin Rcs stres yanıtında etkili olduğunu göstermiştir. Laubaher ve Ades (2021) Rcs yanıtının da beta-laktam antibiyotiklerine karşı direnç oluşturma fonksiyonu sergilediğini belirtmiştir. Ayrıca Dam ve diğ., (2017) MicC sRNA molekülünün OmpC/N üzerinde kontrol gerçekleştirdiğini ve böylelikle beta-laktam antibiyotiklerine karşı yanıtta görev aldığını göstermiştir. Dahası OmpC temas bağımlı etkileşimde sinyal moleküllerin tanınmasında reseptör olarak işlev sergilemektedir (Beck ve diğ., 2016). Eldeki bulgular neticesinde sistein sentaz A proteinin varlığı ve bu proteinin temas bağımlı büyüme inhibisyonunda uyarılması nedeniyle (Diner ve diğ., 2012), kültür ortamında *E. coli* ve *S. pombe*’nin temas halinde olduğunu göstermektedir. Dupont ve diğ., (2007) çevresel strese erken yanıtta OmpX ve OmpF’nin işlevsel olduğunu göstermiştir. Choi and Lee (2019), OmpC’nin hem antibiyotik yanıtında hem de hücre membranının bütünlüğünün sağlanmasında görev aldığını belirtmiştir. Ghai ve diğ., (2018) OmpF’nin yapılarına ve dipolar özelliklerine bağlı olarak benzer büyüklükteki moleküllere seçici geçirgenlik gösterebildiğini, yaygın bir şekilde kullanılan bir antibiyotik olan ampisilinin

kimyasal kararlılığının, periplazmadaki hedefe ulaşmak için OmpF'ye nüfuz etmede önemli bir faktör olduğunu bildirmiştir. Bakterinin dış yüzeye yerleşmesini sağlayan fimbrianın oluşması ve işlevselleşmesi FocC ve FocD'ye bağlıdır (Klemm ve diğ., 1994,1995). FimC de fimbria biyogenezinde şaperon olarak görev almaktadır (Choudhury ve diğ., 1999).

Bakteriler biyoteknolojik süreçlerde yaygın olarak kullanılan organizmalardır. Özellikle hücre dışına salgıladıkları çeşitli enzimlerle tıp, gıda ve çevre endüstrilerinde oldukça kullanılırlar. N-etilmaleimid redüktaz enzimi, 2,4,6-trinitrotoluen (TNT) gibi toksik kirleticileri parçalamaktadır. Nema, NfsA ve NfsB ile aromatik halka üzerindeki nitro gruplarını indirger. Böylece *E. coli* hücre büyümesi için nitrojen kullanmaktadır (González-Pérez ve diğ., 2007). Altı değerlikli Krom (Cr VI) ciddi bir çevre kirleticisidir ve bu formuyla suda yüksek oranda çözünmektedir. Cr VI'yı daha az toksik ve çözünmez formu olan Cr III'e çeviren bakteriler keşfedilmiştir. Robins ve diğerleri (2013) yaptıkları bir çalışmada *E. coli* Nema 'sının yüksek verimle çalışan bir Cr VI redüktaz olduğunu keşfetmişlerdir.

Tez çalışmasında elde edilen proteinlerden biri olan N-etilmaleimid redüktaz (Nema) biyoteknolojide karşımıza çıkan önemli proteinlerden birisidir (González-Pérez ve diğ., 2007). Bunun gibi ilgili proteinlerin eldesinde farklı biyosüreçler karşımıza çıkmakta ve bunların fizibiliteleri yapılmaktadır. Ko-kültür sistemleri biyoteknolojik çalışmalara oldukça uyarlanabilen sistemlerdir. Ko-kültür sistemleriyle anlatımının arttığı düşünülen ürünlerin ileri moleküler analizleri ve fizibiliteleri yapılarak, daha düşük maliyette daha verimli ürün eldesinin sağladığı keşfedilirse, Nema gibi enzimlerin yüksek verimli üretilmesiyle biyoteknolojik çalışmalara katkı sağlanabilir. Elde edilen bulgular ışığında, ko-kültür ortamında *E.coli*'nin yukarıda bahsi geçen proteinleri oluşturmalarının ortam şartlarından ve *S. Pombe*'den kaynaklı olan streslere karşı yanıtı olarak değerlendirilebilir.

Bugüne kadar yürütülen birçok mikrobiyal rekabet çalışmasının en önemli sınırlaması, in vitro çalışmalardan elde edilen verilerin daha doğal ortamlarda test edilememiş olmasıdır. Özellikle saf kültürlerle yapılan çalışmalar ikincil metabolitlerin etkileşimini hesaba katmaz ve mikroorganizmaların birbirlerine karşı davranışlarını anlamlandırmamıza sınırlı bir bakış açısı sağlar (Park ve diğ., 2011; Nai ve Meyer 2018). Bu bağlamda yapılan in vitro çalışmalarda ko-kültürlerin kullanılması ve doğal ortam şartlarının yaratılması, bu çalışmaların ilerlemesi açısından oldukça önemlidir. Ko-kültür sistemlerinin kurulması ve bu sistemlerin geliştirilmesi

çeşitli biyolojik soruların yanıtlanmasına ve çeşitli biyolojik sorunların üstesinden gelinmesine katkı sağlayacaktır.

Tek bir mikroorganizmada kolayca yapılandırılmayan özellikler olan mikroorganizmaların dirençlilikleri, değişen ortamlarda metabolizmanın kararlılığı ve strese karşı göstermiş oldukları yanıtlardaki değişiklikler, toksik metabolik atıklara veya hammaddedeki bileşiklere toleransları gibi özellikler ko-kültürlerle anlaşılabilir (Zhu ve diğ., 2012; Ortiz-Marquez ve diğ., 2013).

Bu tez çalışması *S. pombe* ve *E. coli* ko-kültürlerinin kurulması ve kültür besiyerinde ortaya çıkan proteinlerin incelenmesini içermektedir. SDS-Page sonrasında kalitatif olarak farklılığı saptanan başka bantların da analizleri yapılarak çalışma genişletilebilir. Biyoinformatik analizler elde edilen verilerin yorumlanması için oldukça önemlidir. Proteinlerin hangi yollarla işlev gördükleri ve aralarındaki ilişkiler değerlendirilmeli, önemlilik arz eden proteinlerin ileriki çalışmalarda gen ekspresyon seviyelerine yönelik çalışmalar yapılarak şu an elde edilen veriler kuvvetlendirilebilir. Bu çalışmada elde edilen sonuçlar, ko-kültür sisteminde *S. pombe* ve *E. coli* mikroorganizmalarının metabolizmalarında meydana gelen değişikliklerle temel bilime, bu değişiklikler sonucunda ürettikleri ürünlerle de gelecekte yapılacak biyoteknolojik çalışmalara katkı sağlayabilir.

KAYNAKLAR

- Ackerley, D.F., Gonzalez, C.F., Park, C.H., Blake, R., Keyhan, M., & Matin, A., 2004, Chromate-reducing properties of soluble flavoproteins from *Pseudomonas putida* and *Escherichia coli*, *Applied and environmental microbiology*, 70 (2), 873–882.
- Ackermann, M., 2015, A functional perspective on phenotypic heterogeneity in microorganisms, *Nature reviews microbiology*, 13 (8), 497–508.
- Aldén, L., Demoling, F., & Bååth, E., 2001, Rapid method of determining factors limiting bacterial growth in soil, *Applied and environmental microbiology*, 67 (4), 1830–1838.
- Almirón, M., Link, A.J., Furlong, D., & Kolter, R., 1992, A novel DNA-binding protein with regulatory and protective roles in starved *Escherichia coli*, *Genes & development*, 6 (12B), 2646–2654. <https://doi.org/10.1101/gad.6.12b.2646>.
- An, D., Danhorn, T., Fuqua, C., & Parsek, M. R., 2006, Quorum sensing and motility mediate interactions between *Pseudomonas aeruginosa* and *Agrobacterium tumefaciens* in biofilm cocultures, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103 (10), 3828–3833.
- Anderson, G.G., Palermo, J.J., Schilling, J.D., Roth, R., Heuser, J., & Hultgren, S. J., 2003, Intracellular bacterial biofilm-like pods in urinary tract infections, *Science*, 301 (5629), 105–107. <https://doi.org/10.1126/science.1084550>.
- Atlas, R.M., Bartha, R., 1998, *Microbial ecology: fundamentals and applications*, 4th ed., Addison Wesley Longman California, ISBN: 0805306552.
- Bader, J., Mast-Gerlach, E., Popović, M.K., Bajpai, R., & Stahl, U., 2010, Relevance of microbial coculture fermentations in biotechnology, *Journal of applied microbiology*, 109 (2), 371–387.
- Bailey, J.E., Ollis, D.F., 1986, *Biochemical engineering fundamentals*, 2nd ed. McGraw-Hill, New York, ISBN: 9781138748071.
- Barber, M.F., & Elde, N.C., 2015, Buried treasure: evolutionary perspectives on microbial iron piracy, *Trends in genetics: TIG*, 31 (11), 627–636.
- Bauer, M.A., Kainz, K., Carmona-Gutierrez, D., & Madeo, F., 2018, Microbial wars: Competition in ecological niches and within the microbiome, *Microbial cell*, 5 (5), 215–219.
- Beck, C.M., Willett, J.L., Cunningham, D.A., Kim, J.J., Low, D.A., & Hayes, C.S., 2016, CdiA effectors from uropathogenic *Escherichia coli* use heterotrimeric osmoporins as receptors to recognize target bacteria, *Plos pathogens*, 12 (10), e1005925.
- Bertrand, S., Bohni, N., Schnee, S., Schumpp, O., Gindro, K., & Wolfender, J.L., 2014, Metabolite induction via microorganism co-culture: a potential way to enhance chemical diversity for drug discovery, *Biotechnology advances*, 32 (6), 1180–1204.

- Blattner, F.R., Plunkett, G., Bloch, C.A., Perna, N.T., Burland, V., Riley, M., Collado-Vides, J., Glasner, J.D., Rode, C.K., Mayhew, G.F., Gregor, J., Davis, N.W., Kirkpatrick, H.A., Goeden, M.A., Rose, D.J., Mau, B. and Shao, Y., 1997, The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12, *Science*, 277 (5331), 1453–1462.
- Blount, Z.D., 2015, The unexhausted potential of *E. coli*, *eLife*, 4, e05826.
- Borgeaud, S., Metzger, L.C., Scrignari, T., & Blokesch, M., 2015, The type VI secretion system of *Vibrio cholerae* fosters horizontal gene transfer, *Science*, 347 (6217), 63–67.
- Brakhage, A.A., 2013, Regulation of fungal secondary metabolism,. *Nature reviews, Microbiology*, 11 (1), 21–32.
- Bren, A., Hart, Y., Dekel, E., Koster, D., & Alon, U., 2013, The last generation of bacterial growth in limiting nutrient, *BioMad Central systems biology*, 7, 27.
- Brenner, D.J., Krieg, N.R., Staley, J.T., 2004, *The Gammaproteobacteria*, Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (2nd), In: Garrity, G.M., (ed.). Springer, New York, 1108.
- Brune, K.D., & Bayer, T.S., 2012, Engineering microbial consortia to enhance biomining and bioremediation, *Frontiers in microbiology*, 3, 203.
- Bryant F. R., 1988, Construction of a recombinase-deficient mutant *recA* protein that retains single-stranded DNA-dependent ATPase activity, *The Journal of biological chemistry*, 263(18), 8716–8723.
- Chao, L., & Levin, B.R., 1981, Structured habitats and the evolution of anticompetitor toxins in bacteria, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 78 (10), 6324–6328.
- Charusanti, P., Fong, N.L., Nagarajan, H., Pereira, A.R., Li, H.J., Abate, E.A., Su, Y., Gerwick, W.H., & Palsson, B.O., 2012, Exploiting adaptive laboratory evolution of *Streptomyces clavuligerus* for antibiotic discovery and overproduction, *Plos one*, 7 (3), e33727.
- Chen, G.Q., 2012, New challenges and opportunities for industrial biotechnology, *Microbial cell factories*, 11, 111.
- Choi, U., & Lee, C. R., 2019, Distinct roles of outer membrane porins in antibiotic resistance and membrane integrity in *Escherichia coli*, *Frontiers in microbiology*, 10, 953.
- Choudhury, D., Thompson, A., Stojanoff, V., Langermann, S., Pinkner, J., Hultgren, S.J., & Knight, S. D., 1999, X-ray structure of the FimC-FimH chaperone-adhesin complex from uropathogenic *Escherichia coli*, *Science*, 285 (5430), 1061–1066. <https://doi.org/10.1126/science.285.5430.1061>.
- Costello, G., Rodgers, L., Beach, D., 1986, Fission yeast enters the stationary phase G0 state from either mitotic G1 or G2, *Current Genetics*, 11: 119–125.
- Cottet, S., Corthésy-Theulaz, I., Spertini, F., & Corthésy, B., 2002, Microaerophilic conditions permit to mimic in vitro events occurring during *in vivo Helicobacter pylori* infection and

- to identify Rho/Ras-associated proteins in cellular signaling, *The Journal of biological chemistry*, 277 (37), 33978–33986.
- Cueto, M., Jensen, P.R., Kauffman, C., Fenical, W., Lobkovsky, E., & Clardy, J., 2001, Pestalone, a new antibiotic produced by a marine fungus in response to bacterial challenge, *Journal of natural products*, 64 (11), 1444–1446.
- Da Silva, G.P., Mack, M., & Contiero, J., 2009, Glycerol: a promising and abundant carbon source for industrial microbiology, *Biotechnology advances*, 27 (1), 30–39.
- Dam, S., Pagès, J. M., & Masi, M., 2017, Dual regulation of the small RNA MicC and the quiescent porin ompn in response to antibiotic stress in *Escherichia coli*, *Antibiotics*, 6 (4), 33. <https://doi.org/10.3390/antibiotics6040033>.
- De Kruif, P., 1926, *Microbe hunters*, Harcourt Brace Jovanovich, San Diego, New York London, ISBN-10: 154361955X
- Dekoninck, K., Létoquart, J., Laguri, C., Demange, P., Bevernaegie, R., Simorre, J.P., Dehu, O., Iorga, B.I., Elias, B., Cho, S.H., & Collet, J.F., 2020, Defining the function of OmpA in the Rcs stress response, *eLife*, 9, e60861. <https://doi.org/10.7554/eLife.60861>.
- Diggle, S.P., Griffin, A.S., Campbell, G.S., & West, S.A., 2007, Cooperation and conflict in quorum-sensing bacterial populations, *Nature*, 450 (7168), 411–414.
- Diner, E.J., Beck, C.M., Webb, J.S., Low, D.A., & Hayes, C.S., 2012, Identification of a target cell permissive factor required for contact-dependent growth inhibition (CDI), *Genes & development*, 26 (5), 515–525. <https://doi.org/10.1101/gad.182345.111>.
- Dupont, M., James, C.E., Chevalier, J., & Pagès, J.M., 2007, An early response to environmental stress involves regulation of OmpX and OmpF, two enterobacterial outer membrane pore-forming proteins, *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 51 (9), 3190–3198. <https://doi.org/10.1128/AAC.01481-06>.
- Edwards, R., Baker, H.M., Whittaker, M.M., Whittaker, J.W., Jameson, G.B., & Baker, E.N., 1998, Crystal structure of *Escherichia coli* manganese superoxide dismutase at 2.1-Å resolution, *JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 3, 161–171.
- Egel, R., 2004, *The molecular biology of Schizosaccharomyces pombe: genetics, genomics and beyond.*, Springer, Verlag, Berlin, ISBN: 978-3642056314.
- Egli, T., Lendenmann, U., Snozzi, M., 1993, Kinetics of microbial growth with mixtures of carbon sources, *Antonie van leeuwenhoek*, 63: 289–298.
- Escherich, T., 1988, The intestinal bacteria of the neonate and breast-fed infant, *Reviews of infectious diseases*, 10 (6), 1220–1225.
- Fantes, P.A., & Hoffman, C.S., 2016, A brief history of *Schizosaccharomyces pombe* research: a perspective over the past 70 years, *Genetics*, 203 (2), 621–629.

- Felisberto-Rodrigues, C., Durand, E., Aschtgen, M.S., Blangy, S., Ortiz-Lombardia, M., Douzi, B., Cambillau, C., & Cascales, E., 2011, Towards a structural comprehension of bacterial type VI secretion systems: characterization of the TssJ-TssM complex of an *Escherichia coli* pathovar, *PLos pathogens*, 7 (11), e1002386.
- Ferenci, T., 1996, Adaptation to life at micromolar nutrient levels: the regulation of *Escherichia coli* glucose transport by endoinduction and cAMP, *Federation of european microbiological societies microbiology reviews*, 18: 301–317.
- Fischer, A., 1918, Acid production graphically registered as an indicator of the vital processes in the cultivation of bacteria, *The Journal of experimental medicine*, 28(5), 529–545.
- Fredrickson, A.G., & Stephanopoulos, G., 1981, Microbial competition, *Science*, 213 (4511), 972–979.
- Freese, P.D., Korolev, K.S., Jiménez, J.I., & Chen, I.A., 2014, Genetic drift suppresses bacterial conjugation in spatially structured populations, *Biophysical journal*, 106 (4), 944–954.
- Fuqua, C., & Greenberg, E.P., 2002, Listening in on bacteria: acyl-homoserine lactone signalling, *Nature reviews molecular cell biology*, 3(9), 685–695.
- Ghai, I., Bajaj, H., Arun Bafna, J., El Damrany Hussein, H. A., Winterhalter, M., & Wagner, R., 2018, Ampicillin permeation across OmpF, the major outer-membrane channel in *Escherichia coli*, *The Journal of biological chemistry*, 293 (18), 7030–7037.
- Ghoul, M., & Mitri, S., 2016, The ecology and evolution of microbial competition, *Trends in microbiology*, 24 (10), 833–845.
- Goers, L., Freemont, P., & Polizzi, K. M., 2014, Co-culture systems and technologies: taking synthetic biology to the next level, *Journal of the royal society, interface*, 11 (96), 20140065.
- Gonzalez, C.F., Ackerley, D.F., Lynch, S.V., & Matin, A., 2005, ChrR, a soluble quinone reductase of *Pseudomonas putida* that defends against H₂O₂, *The Journal of biological chemistry*, 280 (24), 22590–22595. <https://doi.org/10.1074/jbc.M501654200>
- Gonzalez, R., Murarka, A., Dharmadi, Y., & Yazdani, S. S., 2008, A new model for the anaerobic fermentation of glycerol in enteric bacteria: trunk and auxiliary pathways in *Escherichia coli*. *Metabolic engineering*, 10(5), 234–245. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2008.05.001>.
- Gore, J., Youk, H., & van Oudenaarden, A., 2009, Snowdrift game dynamics and facultative cheating in yeast, *Nature*, 459 (7244), 253–256.
- Grebe, S. K., & Singh, R. J., 2011, LC-MS/MS in the Clinical Laboratory - Where to From Here?. *The Clinical biochemist, Reviews*, 32(1), 5–31.
- Griffin, A.S., West, S.A., & Buckling, A., 2004, Cooperation and competition in pathogenic bacteria, *Nature*, 430 (7003), 1024–1027.

- Gutz, H., Heslot, H., Leupold, U., Loprieno, N., 1974, *Schizosaccharomyces pombe*, Handbook of Genetics, In: King, R.C. (ed.), Bölüm 25, Plenum Press, New York, ISBN: 978-1-4615-7148-3, 395–446.
- Hall-Stoodley, L., Costerton, J.W., & Stoodley, P., 2004, Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases, *Nature reviews Microbiology*, 2 (2), 95–108.
- Hibbing, M.E., Fuqua, C., Parsek, M.R., & Peterson, S.B., 2010, Bacterial competition: surviving and thriving in the microbial jungle, *Nature reviews Microbiology*, 8 (1), 15–25.
- Hirakawa, H., Suzue, K., Takita, A., Kamitani, W., & Tomita, H., 2021, Roles of OmpX, an outer membrane protein, on virulence and flagellar expression in uropathogenic *Escherichia coli*, *Infection and immunity*, 89 (6), e00721-20.
- Hoffman, C.S, Wood, V., Fantes, P.A, 2015, An ancient yeast for young geneticists: a primer on the *Schizosaccharomyces pombe* model system, *Genetics*, 201, 403- 423.
- Hua, Q., Yang, C., Oshima, T., Mori, H., & Shimizu, K., 2004, Analysis of gene expression in *Escherichia coli* in response to changes of growth-limiting nutrient in chemostat cultures, *Applied and environmental microbiology*, 70 (4), 2354–2366.
- Inglis, D.O., Binkley, J., Skrzypek, M.S., Arnaud, M.B., Cerqueira, G.C., Shah, P., Wymore, F., Wortman, J. R., & Sherlock, G., 2013, Comprehensive annotation of secondary metabolite biosynthetic genes and gene clusters of *Aspergillus nidulans*, *A. fumigatus*, *A. niger* and *A. Oryzae*, *BMC microbiology*, 13, 91.
- Kalia, V.C., 2013, Quorum sensing inhibitors: an overview, *Biotechnology advances*, 31 (2), 224–245.
- Kim, W., Racimo, F., Schluter, J., Levy, S.B., & Foster, K.R., 2014, Importance of positioning for microbial evolution, *Proceedings of the national academy of sciences of the united states of america*, 111 (16), E1639–E1647.
- Kitney, R., & Freemont, P., 2012, Synthetic biology- the state of play. *FEBS letters*, 586 (15), 2029–2036.
- Klemm, P., Christiansen, G., Kreft, B., Marre, R., Bergmans, H., 1994, Reciprocal exchange of minor components of type 1 and F1C fimbriae results in hybrid organelles with changed receptor specificities, *Journal Bacteriology*, 176:2227–2234
- Klemm, P., Jorgensen, B. J., Kreft, B., Christiansen, G., 1995, The export systems of type 1 and F1C fimbriae are interchangeable but work in parental pairs, *Journal Bacteriology*, 177:621–627.
- Knight, V., Sanglier, J.J., DiTullio, D., Braccili, S., Bonner, P., Waters, J., Hughes, D., & Zhang, L, 2003, Diversifying microbial natural products for drug discovery, *Applied microbiology and biotechnology*, 62 (5-6), 446–458.

- Kurosawa, K., Ghiviriga, I., Sambandan, T.G., Lessard, P.A., Barbara, J.E., Rha, C., & Sinskey, A.J., 2008, Rhodostreptomycins, antibiotics biosynthesized following horizontal gene transfer from *Streptomyces padanus* to *Rhodococcus fascians*, *Journal of the American Chemical Society*, 130 (4), 1126–1127.
- Leupold, U., 1993, *The origins of Schizosaccharomyces pombe genetics*, The early days of yeast genetics, In: Hall, M.N., Linder, P. (Eds), Cold spring harbor laboratory press, New York, p 125–128.
- Li, B., Huang, Q., Cui, A., Liu, X., Hou, B., Zhang, L., Liu, M., Meng, X., & Li, S., 2018, Overexpression of outer membrane protein x (Ompx) compensates for the effect of tolC inactivation on biofilm formation and curli production in extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* (ExPEC), *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 8, 208.
- Lock, A., Rutherford, K., Harris, M.A., Hayles, J., Oliver, S.G., Bähler, J., Wood, V., 2018, PomBase 2018: user-driven reimplementations of the fission yeast database provides rapid and intuitive access to diverse, interconnected information, *Nucleic acids research*, 47 (D1), D821–D827.
- Lok, C., 2015, Mining the microbial dark matter, *Nature*, 522 (7556), 270–273.
- Madigan, M.T., Martinko, J.M., 2006, *Brock biology of microorganisms*, Prentice Hall, Upper Saddle River, NJ, ISBN 0-13-144329-1.
- Matin, A., 1979, *Microbial regulatory mechanisms at low nutrient concentrations as studied in chemostat*, Strategies of microbial life in extreme environments: report of the dählem workshop on strategy of life in extreme environments, In: Shilo, M. (ed.) Weinheim: Verlag Chemie, 323–339.
- McCord, J.M., 1993, Oxygen-derived free radicals, *New horizons*, 1(1), 70–76.
- Mearns-Spragg, A., Bregu, M., Boyd, K.G., & Burgess, J.G., 1998, Cross-species induction and enhancement of antimicrobial activity produced by epibiotic bacteria from marine algae and invertebrates, after exposure to terrestrial bacteria, *Letters in applied microbiology*, 27 (3), 142–146.
- Mi, H., Muruganujan, A., Casagrande, J. ve diğ., 2013, Large-scale gene function analysis with the PANTHER classification system. *Nat Protoc* 8, 1551–1566.
- Mignot, T., & Nöllmann, M., 2017, New insights into the function of a versatile class of membrane molecular motors from studies of *Myxococcus xanthus* surface (gliding) motility, *Microbial cell*, 4 (3), 98–100.
- Monod, J., 1949, The growth of bacterial cultures, *Annual review of microbiology*, 1949; 3:371–394.
- Moraes, C., Mehta, G., Leshner-Perez, S.C., & Takayama, S., 2012, Organs-on-a-chip: a focus on compartmentalized microdevices, *Annals of biomedical engineering*, 40 (6), 1211–1227.

- Moriarty, D.J.W., 1993, *Bacterial growth and starvation in aquatic environments*, Starvation in Bacteria, In: Kjelleberg, S. (ed.), Chapter 2, Plenum Press, New York, 25–53.
- Morita, R.Y., 1993, Bioavailability of energy and the starvation state, Starvation in Bacteria, In: Kjelleberg, S. (ed.), Chapter 1, Plenum Press, New York 1-23
- Munz, P., Wolf, K., Kohli, J., Leupold, U., 1989, *Genetics overview, molecular biology of the fission yeast*, In: Nasim A., Young P., Johnson F.B. (eds.), Chapter 1, Academic Press, San Diego, California.
- Nadell, C.D., & Bassler, B.L., 2011, A fitness trade-off between local competition and dispersal in *Vibrio cholerae* biofilms, *Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America*, 108 (34), 14181–14185.
- Nai, C., & Meyer, V., 2018, From axenic to mixed cultures: technological advances accelerating a paradigm shift in microbiology, *Trends in microbiology*, 26 (6), 538–554.
- Nair, S., & Finkel, S.E., 2004, Dps protects cells against multiple stresses during stationary phase, *Journal of bacteriology*, 186 (13), 4192–4198.
- Nurse, P., 2002, Cyclin dependent kinases and cell cycle control (nobel lecture), *Chembiochem: a european journal of chemical biology*, 3 (7), 596–603.
- Oh, D.C., Kauffman, C.A., Jensen, P.R., & Fenical, W., 2007, Induced production of emericellamides A and B from the marine-derived fungus *Emericella* sp. in competing co-culture, *Journal of natural products*, 70 (4), 515–520.
- Park, J., Kerner, A., Burns, M.A., & Lin, X.N., 2011, Microdroplet-enabled highly parallel co-cultivation of microbial communities, *Plos one*, 6 (2), e17019.
- Pettit, R.K., 2009, Mixed fermentation for natural product drug discovery, *Applied microbiology and biotechnology*, 83 (1), 19–25.
- Rendueles, O., & Ghigo, J. M., 2012, Multi-species biofilms: how to avoid unfriendly neighbors, *Federation of european microbiological societies microbiology reviews*, 36 (5), 972–989.
- Rendueles, O., Travier, L., Latour-Lambert, P., Fontaine, T., Magnus, J., Denamur, E., & Ghigo, J.M., 2011, Screening of *Escherichia coli* species biodiversity reveals new biofilm-associated antiadhesion polysaccharides, *Micro-biology*, 2 (3), e00043–e11.
- Riley, M.A., & Gordon, D.M., 1999, The ecological role of bacteriocins in bacterial competition, *Trends in microbiology*, 7 (3), 129–133.
- Rusch, D.B., Halpern, A.L., Sutton, G., Heidelberg, K.B., Williamson, S., Yooseph, S., Wu, D., Eisen, J.A., Hoffman, J.M., Remington, K., Beeson, K., Tran, B., Smith, H., Baden-Tillson, H., Stewart, C., Thorpe, J., Freeman, J., Andrews-Pfannkoch, C., Venter, J.E., Li, K., ... Venter, J.C., 2007, The Sorcerer II Global ocean sampling expedition: northwest Atlantic through eastern tropical Pacific, *PLos biology*, 5 (3), e77.

- Russell, A.B., Peterson, S.B., & Mougous, J.D., 2014, Type VI secretion system effectors: poisons with a purpose, *Nature reviews Microbiology*, 12 (2), 137–148.
- Sabatinos, S.A. ve Forsburg, S.L., 2010, *Molecular genetics of Schizosaccharomyces pombe*, Methods in enzymology, In: Fink E., Weissman, J. ve Guthrie, (Eds), Academic press, ABD, ISBN: 978-0-12-418687-3, 759-795.
- Sambrook, J.F ve Russell, D.W., 2001, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, In: Sambrook, J.F ve Russell, D.W. (ed.), Third Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sanchez, J.F., Somoza, A.D., Keller, N.P., & Wang, C.C., 2012, Advances in *Aspergillus* secondary metabolite research in the post-genomic era, *Natural product reports*, 29 (3), 351–371.
- Scherlach, K., & Hertweck, C., 2009, Triggering cryptic natural product biosynthesis in microorganisms, *Organic & biomolecular chemistry*, 7 (9), 1753–1760.
- Schluter, J., Nadell, C.D., Bassler, B.L., & Foster, K.R., 2015, Adhesion as a weapon in microbial competition, *The the international society for microbial ecology journal*, 9 (1), 139–149.
- Scholz, R.L., & Greenberg, E.P., 2015, Sociality in *Escherichia coli*: Enterochelin Is a private good at low cell density and can be shared at high cell density, *Journal of bacteriology*, 197 (13), 2122–2128. <https://doi.org/10.1128/JB.02596-14>.
- Shulman, S.T., Friedmann, H.C., & Sims, R.H., 2007, Theodor Escherich: the first pediatric infectious diseases physician?, *Infectious diseases society of America*, 45 (8), 1025–1029.
- Singleton, P., 1999, *Bacteria in biology, biotechnology and medicine*, Wiley, Hoboken, ISBN: 978-0-470-09027-5.
- Slooff, W.C., 1970, *Schizosaccharomyces Lindner*. The Yeasts- a Taxonomic Study, In: Lodder J. Amsterdam: North-Holland Publishing Co, 733–755.
- Sogin, M.L., Morrison, H.G., Huber, J.A., Mark W.D., Huse, S.M., Neal, P.R., Arrieta, J.M., & Herndl, G.J., 2006, Microbial diversity in the deep sea and the underexplored "rare biosphere", *Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America*, 103 (32), 12115–12120.
- Stacy, A., McNally, L., Darch, S.E., Brown, S.P., & Whiteley, M., 2016, The biogeography of polymicrobial infection, *Nature reviews microbiology*, 14 (2), 93–105.
- Stewart, E.J., 2012, Growing unculturable bacteria, *Journal of bacteriology*, 194 (16), 4151–4160.
- Taniguchi, M., & Tanaka, T., 2004, Clarification of interactions among microorganisms and development of co-culture system for production of useful substances, *Advances in biochemical engineering/biotechnology*, 90, 35–62.

- The UniProt Consortium, 2021, UniProt: the universal protein knowledgebase in 2021, *Nucleic Acids Research*, Volume 49, Issue D1, Pages D480–D489.
- Thomas, P. D., Campbell, M. J., Kejariwal, A., Mi, H., Karlak, B., Daverman, R., Diemer, K., Muruganujan, A., & Narechania, A., 2003, PANTHER: a library of protein families and subfamilies indexed by function. *Genome research*, 13(9), 2129–2141.
- Thomas, P. D., Kejariwal, A., Guo, N., Mi, H., Campbell, M. J., Muruganujan, A., & Lazareva-Ulitsky, B., 2006, Applications for protein sequence-function evolution data: mRNA/protein expression analysis and coding SNP scoring tools. *Nucleic acids research*, 34(Web Server issue), W645–W650.
- Valle, J., Da Re, S., Henry, N., Fontaine, T., Balestrino, D., Latour-Lambert, P., & Ghigo, J. M., 2006, Broad-spectrum biofilm inhibition by a secreted bacterial polysaccharide, *Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America*, 103 (33), 12558–12563.
- Walker, J.M, 2002, *SDS polyacrylamide gel electrophoresis of proteins*, The Protein Protocols Handbook, In: Walker, J.M. (ed.), Chapter 11, Humana Press Inc, USA, ISBN: 0-89603-940-4, 61-68.
- Walker, J.M., 1994, The bicinchoninic acid (BCA) assay for protein quantitation, *Methods in molecular biology*, 32:5-8. doi: 10.1385/0-89603-268-X:5. PMID: 7951748.
- Waters, C.M., & Bassler, B.L., 2005, Quorum sensing: cell-to-cell communication in bacteria, *Annual review of cell and developmental biology*, 21, 319–346.
- Wessel, D., & Flügge, U.I., 1984, A method for the quantitative recovery of protein in dilute solution in the presence of detergents and lipids, *Analytical biochemistry*, 138 (1), 141–143. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(84\)90782-6](https://doi.org/10.1016/0003-2697(84)90782-6).
- Wick, L. M., Quadroni, M., & Egli, T., 2001, Short- and long-term changes in proteome composition and kinetic properties in a culture of *Escherichia coli* during transition from glucose-excess to glucose-limited growth conditions in continuous culture and vice versa, *Environmental microbiology*, 3 (9), 588–599.
- Wolfender, J.L., Rudaz, S., Choi, Y.H., & Kim, H.K., 2013, Plant metabolomics: from holistic data to relevant biomarkers, *Current medicinal chemistry*, 20 (8), 1056–1090.
- Wood, V., Gwilliam, R., Rajandream, M.A., Lyne, M., Lyne, R., Stewart, A., Sgouros, J., Peat, N., Hayles, J., Baker, S., Basham, D., Bowman, S., Brooks, K., Brown, D., Brown, S., Chillingworth, T., Churcher, C., Collins, M., Connor, R., Cronin, A., ... Nurse, P., 2002, The genome sequence of *Schizosaccharomyces pombe*. *Nature*, 415 (6874), 871–880.
- Wu, M.H., Huang, S.B., & Lee, G.B., 2010, Microfluidic cell culture systems for drug research, *Lab on a chip*, 10 (8), 939–956. <https://doi.org/10.1039/b921695b>.
- Zhang, H., Pereira, B., Li, Z., & Stephanopoulos, G., 2015, Engineering *Escherichia coli* coculture systems for the production of biochemical products, *Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America*, 112 (27), 8266–8271.

- Zhang, W., Liu, H., Li, X., Liu, D., Dong, X.T., Li, F.F., Wang, E.X., Li, B.Z., & Yuan, Y.J., 2017, Production of naringenin from D-xylose with co-culture of *E. coli* and *S. Cerevisiae*, *Engineering in life sciences*, 17 (9), 1021–1029.
- Zhou, K., Qiao, K., Edgar, S., & Stephanopoulos, G., 2015, Distributing a metabolic pathway among a microbial consortium enhances production of natural products, *Nature biotechnology*, 33 (4), 377–383.
- Zhu, F., Chen, G., Wu, J., & Pan, J., 2013, Structure revision and cytotoxic activity of marinamide and its methyl ester, novel alkaloids produced by co-cultures of two marine-derived mangrove endophytic fungi, *Natural product research*, 27 (21), 1960–1964.



ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler	
Adı Soyadı	Ayşegül YANIK
Doğum Yeri	
Doğum Tarihi	Tarih girmek için tıklayın veya dokununuz.
Uyruğu	☒ T.C. ☐ Diğer:
E-Posta Adresi	
Web Adresi	

Eğitim Bilgileri	
Lisans	
Üniversite	İstanbul Üniversitesi
Fakülte	Fen Fakültesi
Bölümü	Moleküler Biyoloji ve Genetik
Mezuniyet Yılı	14.06.2017

Yüksek Lisans	
Üniversite	İstanbul Üniversitesi
Enstitü Adı	Fen Bilimleri Enstitüsü
Anabilim Dalı	Moleküler Biyoloji ve Genetik A.B.D.
Programı	Moleküler Biyoloji ve Genetik Tezli Yüksek Lisans